UNTERSUCHUNGEN ZUM PROTEINTURNOVER UND ZUR GLUCOSEABHÄNGIGEN ENZYMINAKTIVIERUNG IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Ulrich Essig
aus Stuttgart

1980

80 66 1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0040

UNTERSUCHUNGEN ZUM PROTEINTURNOVER UND ZUR GLUCOSEABHÄNGIGEN ENZYMINAKTIVIERUNG IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Ulrich Essig

aus Stuttgart

1980

Tag der mündlichen Prüfung:	20.12.1979
Dekan:	Prof. Dr. M. Hanack
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Mecke
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. U. Weser

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (07472) 22145

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. D. Mecke am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. D. Mecke danke ich für das Interesse an meiner Arbeit. Die Diskussionen mit ihm sowie Herrn Dr. J. Neeff, Herrn Dr. K.-D. Entian und Frau Dr. S. Hartmann erbrachten weiterführende Ideen, Hinweise und Vorschläge.

Bei Frau U. Schaal möchte ich mich für ihre selbstverständliche Hilfsbereitschaft bedanken, die auch bei den kleinen Dingen des Laboralltags nie erlahmte.

Den Mitarbeitern des zentralen Isotopenlabors der Universität Tübingen gilt mein Dank für die Überlassung von Apparaturen und ihre kollegiale Hilfe bei der Bewältigung technischer Probleme.

Den Mitarbeitern der Institutswerkstätten danke ich für die Herstellung einer Apparatur.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIALIEN UND METHODEN	5
2.1.	Verwendete Geräte	5
2.2.	Enzyme, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	6
2.3.	Methoden	8
2.3.1.	Hefestämme	8
2.3.2.	Nähr- und Kulturmedien	9
2.3.2.1.	Nähragar	9
2.3.2.2.	Optimalmedium nach Wickerham	9
2.3.2.3.	Optimalmedium nach Zimmermann	9
2.3.2.4.	Synthetisches Medium	10
2.3.2.5.	Minimalmedium	10
2.3.2.6.	Medien für die Inaktivierung	10
2.3.3.	Kultivierung und Haltung der Hefestämme	11
2.3.3.1.	Dauerkulturen	11
2.3.3.2.	Plattenkulturen	11
2.3.3.3.	Subkulturen	11
2.3.3.4.	Hauptkulturen	12
2.3.3.5.	Derepressionskulturen	12
2.3.3.6.	Inaktivierungskulturen	13
2.3.3.7.	Schüttelfrequenz der Submerskulturen	13
2.3.4.	Ernte der Hefezellen und Probennahme	14
2.3.4.1.	Ernte der Hefezellen und Entnahme größerer Proben	14
2.3.4.2.	Probennahme während einer Kinetik und Lagerung der Hefezellen	14
2.3.4.3.	Entnahme kleinerer Proben	14
2.3.5.	Herstellung des Rohextrakts	15
2.3.5.1.	Herstellung des Rohextrakts mit Glasperlen	15
2.3.5.2.	Herstellung des Rohextrakts mit Aluminiumoxid (Alcoa)	15

Seite

2.3.5.3. Aufschluß von Hefezellen mit der French Press 16
2.3.6. Bestimmung der Proteinkonzentration 16
2.3.7. Bestimmung von Enzymaktivitäten 16
2.3.7.1. Bestimmung der Aktivität der Malatdehydrogenase 17
2.3.7.2. Bestimmung der Aktivität der Fructose-1,6-bisphosphatase 18
2.3.8. Bestimmung von Metaboliten 18
2.3.9. Chromatographische Methoden 19
2.3.9.1. Abtrennung von Glucose aus Inaktivierungsmedium mit Hilfe eines Ionenaustauschers 19
2.3.9.2. Dextranblau-Sepharose-Säulenchromatographie 19
2.3.9.3. Dünnschichtchromatographie 20
2.3.10. Elektrophoretische Methoden 21
2.3.10.1. Disc-Polyacrylamidgel-Elektrophorese 21
2.3.10.2. SDS-Disc-Polyacrylamidgel-Elektrophorese 21
2.3.10.3. Papierelektrophorese 22
2.3.11. Proteinanfärbung nach der Polyacrylamidgel-Elektrophorese 23
2.3.12. Einengen von Kulturmedium 23
2.3.13. Bestimmung der Zelldichte 24
2.3.13.1. Auszählen mit der Neubauer-Kammer 24
2.3.13.2. Auszählen der lebensfähigen Zellen ("viable counts") 24
2.3.13.3. Relativbestimmung der Zelldichte durch Trübungsmessung 25
2.3.14. Eingriffe in den Stoffwechsel der Hefezellen 25
2.3.14.1. Eingriff während der Derepression mit Cycloheximid 25
2.3.14.2. Eingriff während der Inaktivierung mit Cycloheximid 26
2.3.15. Radioisotopenmarkierung und -messung 26
2.3.16. Bestimmung des Einbaus von Radioisotopen in Protein 27
2.3.16.1. Bestimmung nach einer selbst entworfenen Methode 27

2.3.16.2.	Bestimmung nach der Methode von Mans und Novelli	27
2.3.17.	Autoradiographie	28
3.	ERGEBNISSE	29
3.1.	Derepression und Inaktivierung	29
3.1.1.	Zur Wahl des Organismus	29
3.1.2.	Verlauf der MDH-Aktivität bei Derepression und Inaktivierung	30
3.1.3.	Fructose-bisphosphatase-Aktivität	32
3.1.4.	Glucoseverbrauch bei der Inaktivierung	33
3.1.5.	Proteinbiosynthese während Derepression und Inaktivierung	34
3.1.6.	Zelldichte bei Derepression und Inaktivierung	37
3.2.	Proteinturnover und Stoffwechsel der Hefe	40
3.2.1.	Vorbemerkungen	40
3.2.2.	Degradation von Protein während der Inaktivierung	40
3.2.2.1.	Degradation von Protein während der Inaktivierung in Minimalmedium	42
3.2.2.2.	Degradation von Protein während der Inaktivierung in Puffer ohne Zusatz von Nährsubstraten	49
3.2.3.	Berechnung von Proteindegradationsraten	54
3.2.4.	Zunahme des niedermolekularen Anteils während der Inaktivierung	59
3.2.5.	Quantitativer Vergleich der Abnahme von markiertem Protein und der Zunahme des niedermolekularen Anteils	63
3.2.6.	Spezifität der Degradation von Proteinen während der Inaktivierung	66
3.2.7.	Abgabe von Radioaktivität in das Kulturmedium	68
3.2.8.	Charakterisierung der in das Inaktivierungsmedium abgegebenen radioaktiven Stoffe	71

Seite

3.2.8.1. Fällbarkeit von Bestandteilen des Inaktivierungsmediums mit TCA 72

3.2.8.2. Ultrafiltration des Inaktivierungsmediums 72

3.2.8.3. Ionenaustauschchromatographie 74

3.2.8.4. Flüchtige Bestandteile des Inaktivierungsmediums 74

3.2.8.5. Papierelektrophorese der nichtflüchtigen Bestandteile des Inaktivierungsmediums 77

3.2.9. Charakterisierung des TCA-löslichen Anteils der Radioaktivität der Zellen 78

3.2.10. Eingriff in den Stoffwechsel mit Cycloheximid während der Derepression 80

3.2.11. Eingriff mit Cycloheximid während der Inaktivierung 82

3.2.12. Verwendung anderer Hefestämme zur Untersuchung des Proteinturnovers und der glucoseabhängigen Enzyminaktivierung 86

4. DISKUSSION 91

5. ZUSAMMENFASSUNG 102

6. LITERATURVERZEICHNIS 104

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bisacrylamid	N,N'-Methylenbisacrylamid
cpm	counts per minute (Zählimpulse pro Minute)
D	Daltons
DC	Dünnschichtchromatographie
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase (E.C. 3.1.3.11)
MDH	Malatdehydrogenase (L-Malat: β-NAD^+-Oxidoreductase, E.C. 1.1.1.37)
c-MDH	cytoplasmatische Malatdehydrogenase
NAD^+	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
$NADP^+$	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduziert)
POPOP	2,2'-p-Phenylen-bis-(5-phenyloxazol)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNA	Ribonucleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute

1. EINLEITUNG

Im Jahr 1942 beobachteten Epps und Gale (1), daß in Bakterien die Synthese verschiedener Enzyme bei Anwesenheit von Glucose im Kulturmedium reprimiert wird. Spiegelman und Reiner (2) berichteten 1947 von derselben Erscheinung bei Hefe.

Eine mögliche Erklärung dieses "Glucose-Effekts" lieferten Neidhardt und Magasanik (3). Die (anabolen) glucose-sensitiven Enzyme katalysieren das Entstehen von Metaboliten, die die Zellen schneller und in größerer Menge aus dem Katabolismus von Glucose erhalten können. Die Akkumulation dieser Metabolite sollte durch einen Feedback-Mechanismus die Synthese jener Enzyme verhindern, die den ohnehin schon großen Metaboliten-Pool nur noch etwas vergrößern würden. Deshalb nannte Magasanik den Effekt später "Katabolit-Repression" (4).

Erstmals im Jahr 1957 berichteten Robertson und Halvorson (5) nicht nur von der Repression der Synthese, sondern auch von der Inaktivierung eines schon gebildeten Enzyms durch Glucose (in der Arbeit von Spiegelman und Reiner (2) wird ein solcher Sachverhalt zwar schon in einem Diagramm gezeigt, jedoch erkannten die Autoren nicht, daß es sich dabei um mehr als nur die Repression der Enzymsynthese handelte). In der Folgezeit wurde dies unter anderem bei Malatdehydrogenase (6), "maltose-uptake system" (7), Fructosebisphosphatase (8) und Phosphoenolpyruvat-carboxykinase (9) in Saccharomyces cerevisiae sowie bei cytoplasmatischer Malatdehydrogenase und Maltosepermease in Saccharomyces carlsbergensis (10) beobachtet. In Saccharomyces carlsbergensis unterliegt die FBPase der Inaktivierung durch Sucrose (11). Die Inaktivierung der FBPase und der PEP-CK in Saccharomyces cerevisiae wird auch durch Fructose und Mannose, nicht jedoch durch 2-Desoxyglucose oder Galaktose ausgelöst (12).

Dieser letzte Befund unterstützt die Hypothese von Holzer (13), daß Metabolite der Glucose die Inaktivierung auslösen. Ein direkter Beweis für diese Hypothese gelang indes nicht, auch in-vitro-Versuche mit verschiedenen Glucosemetaboliten (14,15) blieben erfolglos.

Als mögliche Mechanismen, die in vivo zur Inaktivierung mikrobieller Enzyme führen, wurden diskutiert (16):

1) Die Hemmung des Enzyms durch einen (niedermolekularen) Inhibitor.
2) Die enzymkatalysierte kovalente Modifikation des Enzymproteins.
3) Der proteolytische Abbau des Enzyms.

Verfahren, die zur Abtrennung von niedermolekularen Inhibitoren führen müßten, wie Verdünnen, Dialyse und Erwärmen, führten im Fall der c-MDH aus Saccharomyces cerevisiae nicht zu einer Reaktivierung des Enzyms (17), wie dies z.B. von Bechet und Wiame (18) für Ornithintranscarbamylase beschrieben wurde. Beim Mischen von Rohextrakten dereprimierter und inaktivierter Hefezellen stellte sich immer eine mittlere Enzymaktivität ein (17), so daß auch hiermit das Vorhandensein eines Inhibitors nicht nachgewiesen werden konnte. Aufgrund dieser Befunde scheidet die Hemmung durch einen Inhibitor mit hoher Wahrscheinlichkeit als Erklärung für die Inaktivierung der c-MDH aus.

Alle bisher bekannten Fälle von Enzyminaktivierung durch kovalente Modifikation sind in vivo reversibel (16). Die glucoseabhängige Inaktivierung ist jedoch ein irreversibler Vorgang (8,12,19). Zumindest als alleiniger Mechanismus zur Inaktivierung der glucose-sensitiven Enzyme kommt die kovalente Modifikation daher nicht in Frage.

Ein proteolytischer Abbau von Enzymen als spezifischer regulatorischer Vorgang konnte bisher bei mikrobiellen Systemen nicht nachgewiesen werden. Eine Reihe von Befunden deutet jedoch auf die mögliche Rolle proteolytischer Vorgänge bei der glucoseabhängigen Enzyminaktivierung hin:

1) Die Inaktivierung ist, wie oben erwähnt, irreversibel.

2) Zur Wiedergewinnung der Enzymaktivität ist de-novo-Proteinsynthese erforderlich (7,8,12,19).

3) Ein inaktives Enzymprotein konnte im Fall der c-MDH aus Saccharomyces cerevisiae weder chromatographisch, elektrophoretisch noch mit Hilfe von immunologischen Methoden (Plattendiffusion, Radioimmuntitration) nachgewiesen werden (20,21).

4) FBPase und c-MDH aus Saccharomyces cerevisiae sind in vitro besonders sensitiv gegenüber Protease-Präparationen aus denselben Hefestämmen (22,23,24,25).

Die Beteiligung proteolytischer Vorgänge an der Enzyminaktivierung kann auf verschiedene Weise gezeigt werden. Ein Weg könnte über das Auffinden von Mutanten führen, die bezüglich einer bestimmten Protease defekt sind und nach Zugabe von Glucose keine Enzyminaktivierung mehr zeigen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, sowohl die Degradationsrate eines glucose-sensitiven Enzyms als auch die Degradationsrate des gesamten Proteins unter Inaktivierungsbedingungen zu messen. Der Vergleich der beiden Daten sollte eine Aussage darüber ermöglichen, ob die Inaktivierung eines Enzyms durch enzymspezifische Proteolyse bewirkt wird oder nicht.

Bei keinem der obengenannten Enzyme, die der glucoseabhängigen Inaktivierung unterliegen, wurde bisher der spezifische Enzymturnover und der allgemeine Proteinturnover des Gesamtorganismus unter den Bedingungen der Derepression und Repression/Inaktivierung untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Proteindegradation in der Hefe Saccharomyces cerevisiae während der Inaktivierung der glucose-sensitiven Enzyme zu untersuchen. Des weiteren sollte die Spezifität der Degradation von Proteinen unter Inaktivierungsbedingungen festgestellt werden.

Diese Untersuchungen sollten zeigen, ob für die glucoseab-

hängige Enzyminaktivierung proteolytische Vorgänge in der Zelle in Betracht kommen. Bei positivem Ergebnis ist die Grundlage für die Untersuchung des spezifischen Turnovers eines der glucose-sensitiven Enzyme gegeben.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Verwendete Geräte

Autoklav: Typ F 03, Fedegari, Pavia, Italien

Elektrophorese-Kammern: a) Typ UltraPhor, Colora Meßtechnik GmbH, Lorch

b) Kammer für Papierelektrophorese, Shandon, England

Flüssigszintillationszähler: Typ Betaszint BF 5003 A mit Schreiber Teletype 33 ASR, Berthold, Wildbad

French Press: American Instruments Co., Silver Spring, Maryland, USA

Kryostat: Typ TK 30 D, Meßgeräte-Werk Lauda, Lauda/Tauber

Lyophilisator: Typ L 05, WKF, Brandau/Darmstadt 2

Netzgerät: Typ HNs 1200-02, Heinzinger, Rosenheim

Peristaltische Schlauchpumpen: a) Typ 10200, LKB, Bromma. Schweden

b) minipuls 2, Gilson-France, Villiers-le-Bel, Frankreich

Photometer: a) Eppendorf 1101 M mit Kompensationsschreiber 6511, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg

b) Shimadzu Zweistrahlphotometer UV-140-02, Seisakusho Ltd., Kyoto, Japan

c) Modell 800-3, Klett-Summerson Mfg. Co., Inc., New York, USA

Rundschüttler: a) Lab-Shaker, Modell Kühner, Braun Melsungen AG, Melsungen

b) Inkubationsschrank KF 4/1, Infors AG, Basel, Schweiz

Schüttelmaschine: Vortex-Genie, Scientific Industries Inc., Springfield, Massachusetts, USA

Thermostat: Eppendorf 3401, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg

Trockenkammer für Papierelektropherogramme: Eigenentwicklung, hergestellt von der Werkstatt des Physiologisch-Chemischen Instituts, Universität Tübingen

Trockenkammer für Polyacrylamidgele: dto.
Ultrafiltrationsmembranen: BM 10, Forschungsinstitut Berghof GmbH, Tübingen
Ultrafiltrationszelle: Modell 52, Amicon GmbH, Witten/Ruhr
Zentrifugen: a) Modelle RC-2 u. RC-5, Du Pont Instr./Sorvall
b) Modelle J-21B, J-21C u. L5-65, Beckman Instr. Inc., Palo Alto, California, USA
c) Typ Labofuge III, Heraeus-Christ GmbH, Osterode (Harz)
d) Typ 5412 Eppendorf, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg

2.2. Enzyme, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Enzyme

Glucose-6-phosphat-dehydrogenase aus Hefe (E.C. 1.1.1.49)
Hexokinase aus Hefe (E.C. 2.7.1.1)
Phosphoglucose-isomerase aus Hefe (E.C. 5.3.1.9)

bezogen von Fa. Boehringer, Mannheim

Chemikalien

L-(U-^{14}C)Leucin, >270 mCi/mmol
L-(4,5-^{3}H)Leucin, 500-1000 mCi/mmol

bezogen von Fa. Amersham Buchler, Braunschweig

ATP, Dinatriumsalz
Fructose-1,6-bisphosphat
NAD^+, Dinatriumsalz
NADH
$NADP^+$, Dinatriumsalz
Triäthanolamin-hydrochlorid

bezogen von Fa. Boehringer, Mannheim

Bacto Agar
Bacto Peptone
Malt Extract
Yeast Extract
Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids

bezogen von Fa. Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

L-Äpfelsäure, p.a.
EDTA
Folin-Ciocalteus-Phenolreagens
α-D-Glucose, p.a.
Glycerin, doppelt destilliert
Glycin, für biochemische Zwecke
Hydrazinsulfat, p.a.
L-Leucin, für biochemische Zwecke
Mercaptoäthanol, p.a.
Ninhydrinreagenslösung
POPOP, für Szintillationsmessungen
PPO, für Szintillationsmessungen
Tris, p.a.

bezogen von Fa. Merck, Darmstadt

Acrylamid, 2 x krist.
Ammoniumperoxodisulfat, p.a.
Bisacrylamid, 2 x krist.
Bromphenolblau, Na-Salz, reinst
Coomassie Brilliant Blue G-250, rein
Cycloheximid (Actidion)
N,N,N',N'-Tetramethyl-äthylendiamin, reinst
Triton X 100, p.a., für die Szintillationstechnik

bezogen von Fa. Serva, Heidelberg

Alle weiteren verwendeten Chemikalien waren analysenreine Produkte der Fa. E. Merck, Darmstadt.

Verbrauchsmaterialien

Aluminiumoxid Alcoa A-305, pract. (Fa. Serva, Heidelberg)
DC-Karten SI (Fa. Riedel-de-Haen AG, Seelze)
DC-Platten, Kieselgel 60 F_{254} (Fa. E. Merck, Darmstadt)
Dextranblau 2000 (Fa. Pharmacia AB, Uppsala, Schweden)
Dowex 50 WX 4, 50-100 mesh (Fa. Serva, Heidelberg)
Elektrophoresepapier (Fa. Schleicher & Schüll, Dassel)
Filterblättchen 3 MM (Fa. Whatman Ltd., Springfield Mill, England)
Glasperlen 0,5 mm Durchmesser (Fa. B. Braun, Melsungen)
Röntgenfilm Curix RP1 (Fa. Agfa-Gevaert, Belgien)
CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Fa. Pharmacia AB, Uppsala, Schweden)
Ultrafiltrationsmembranen BM 10 (Fa. Berghof, Tübingen)

2.3. Methoden

2.3.1. Hefestämme

In der vorliegenden Arbeit wurden der Hefestamm Saccharomyces cerevisiae M 1 (26) sowie die beiden leucin-auxotrophen Stämme SMC-19A$^{\alpha}_{leu1}$MAL2-8^{c}MAL3Suc3 und Z9.8A-3C$^{\alpha}_{leu1}$MAL2-8^{c} (27) verwendet. Die beiden leucin-auxotrophen Stämme werden im Text mit SMC-19A und Z9.8A-3C abgekürzt.

2.3.2. Nähr- und Kulturmedien

2.3.2.1. Nähragar (für Schrägröhrchen und Platten)

a) M 1 und leu-auxotrophe Stämme
   1 % Yeast Extract
   2 % Bacto Peptone
   2 % α-D-Glucose
   2 % Bacto Agar

b) leu-auxotrophe Stämme
   0,67 % Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids
   2,29 µM L-Leucin
   2 % α-D-Glucose
   2 % Bacto Agar

gelöst in dest. H_2O

2.3.2.2. Optimalmedium nach Wickerham (28, für die Anzucht von Subkulturen und Hauptkulturen aller Stämme)

   0,3 % Yeast Extract
   0,3 % Malt Extract
   0,5 % Bacto Peptone
   3,0 % α-D-Glucose

gelöst in dest. H_2O

2.3.2.3. Optimalmedium nach Zimmermann (29, für Dauerkulturen)

   1 % Yeast Extract
   2 % Bacto Peptone
   8 % α-D-Glucose

gelöst in dest. H_2O

2.3.2.4. Synthetisches Medium (für Hauptkultur des leu-auxotrophen Stammes SMC-19A)

6,7 % Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids
22,9 µM L-Leucin
3,0 % α-D-Glucose

gelöst in dest. H_2O

2.3.2.5. Minimalmedium (für die Derepression)

a) M 1
O,67 % Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids
O,3 % Natriumacetat
(24,9 µM L-Leucin)

b) leu-auxotrophe Stämme
O,67 % Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids
O,3 % Natriumacetat
O-229 µM L-Leucin

gelöst in dest. H_2O oder in O,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6,5

2.3.2.6. Medien für die Inaktivierung

a) wie Minimalmedium (s. 2.3.2.5.) + 3 % α-D-Glucose

b) 3 % α-D-Glucose in O,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,5

2.3.3. Kultivierung und Haltung der Hefestämme

2.3.3.1. Dauerkulturen

a) Der Stamm M 1 wurde in Schrägröhrchen bei 4°C gehalten.

b) Die leu-auxotrophen Stämme wurden in Schrägröhrchen sowie im Optimalmedium nach Zimmermann (29) bei 4°C gehalten.

Die Dauerkulturen wurden nach ca. einem Jahr erneuert.

2.3.3.2. Plattenkulturen

Die Stämme wurden von den Dauerkulturen mit einer Impföse auf die jeweiligen Agarplatten überimpft.

Der Stamm M 1 wurde zwei Tage, die leu-auxotrophen Stämme drei Tage bei 29°C inkubiert und bei 4°C gelagert.
Die Plattenkulturen wurden alle zwei Monate erneuert.

2.3.3.3. Subkulturen

a) M 1 und leu-auxotrophe Stämme
Die Stämme wurden von den Plattenkulturen mit einer Impföse auf Optimalmedium nach Wickerham überimpft (1 Impföse pro 100 ml).
Die Kulturen wurden in Erlenmeyerkolben mit vier Schikanen bei 29°C 48 Stunden auf dem Rundschüttler geschüttelt. Das Volumen der Erlenmeyerkolben betrug mindestens das Fünffache des Kulturvolumens. Die Schüttelfrequenz wurde so gewählt, daß die Kultur auf keinen Fall bis zum Stopfen spritzen konnte, so daß eine Infektion über einen feuchtgewordenen Stopfen ausgeschlossen war.
Die Subkulturen wurden bei 4°C gelagert und alle vier Wochen erneuert.

b) leu-auxotrophe Stämme
Je 1 Impföse der abgesetzten Zellen der Dauerkulturen in Optimalmedium nach Zimmermann (29) wurde in 100 ml Optimalmedium nach Wickerham überimpft. Danach wurde wie unter a) beschrieben weiter verfahren.

2.3.3.4. Hauptkulturen

a) M 1 und leu-auxotrophe Stämme
Je 0,1 ml der Subkulturen wurden in 100 ml Optimalmedium nach Wickerham überimpft. Die Kulturen wurden in Erlenmeyerkolben mit vier Schikanen bei 29°C auf dem Rundschüttler geschüttelt.
Die Dauer der Hauptkultur betrug beim Stamm M 1 14 Stunden, beim Stamm SMC-19A 16 Stunden, beim Stamm Z9.8A-3C ca. 19 Stunden.

b) leu-auxotropher Stamm SMC-19A
0,1 ml der Subkultur wurde in 100 ml synthetisches Medium überimpft. Danach wurde wie unter a) beschrieben weiter verfahren. Die Dauer der Kultur betrug bis zur späten logarithmischen Phase 22 Stunden, bis zur stationären Phase ca. 26 Stunden.

2.3.3.5. Derepressionskulturen

Die Zellen aus der jeweiligen Hauptkultur wurden abzentrifugiert (s. Kapitel 2.3.4.1.) und zweimal mit kaltem dest. H_2O gewaschen und wieder abzentrifugiert (Feuchthefe).

Zur Derepression wurden 5 g Feuchthefe pro Liter in Minimalmedium suspendiert. Dies entspricht einer Zelldichte von ca. 5×10^7 bis 10^8 Zellen pro ml. Die Kulturen wurden in Erlenmeyerkolben mit vier Schikanen bei 29°C auf dem Rundschüttler geschüttelt.

Die Derepression dauerte beim Stamm M 1 im allgemeinen 5 Stunden, bei den leucin-auxotrophen Stämmen wurde je nach Versuch zwischen 7,5 und 24,5 Stunden variiert.

2.3.3.6. Inaktivierungskulturen

Je nach Versuch wurden die Zellen der Derepressionskulturen entweder in dem Minimalmedium belassen und die α-D-Glucose für die Inaktivierung zugesetzt oder sie wurden in eines der beiden in Kapitel 2.3.2.6. genannten Inaktivierungsmedien überführt, nachdem sie mit kaltem dest. H_2O, Minimalmedium oder 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,5, gewaschen worden waren.

Die Inaktivierung wurde je nach Versuch 1,5 bis 7 Stunden lang verfolgt.

Alle Nähr- und Kulturmedien, Gefäße und Pipetten wurden 20 Minuten bei 120°C sterilisiert (Autoklav, Fa. Fedegeri). Die Kulturen wurden steril beimpft. Lediglich bei den Derepressions- und Inaktivierungskulturen war steriles Überführen im allgemeinen nicht mehr notwendig.

2.3.3.7. Schüttelfrequenz der Submerskulturen

Die folgenden Zahlen können als Anhaltspunkte für die Schüttelfrequenzen bei verschiedenen Kolbengrößen dienen:
50-ml- und 100-ml-Kolben: 130 - 180 Upm
300-ml-, 500 ml- und 1-l-Kolben: 100 - 120 Upm
2-l-, 3-l- und 5-l-Kolben: 80 - 95 Upm

2.3.4. Ernte der Hefezellen und Probennahme

2.3.4.1. Ernte der Hefezellen und Entnahme größerer Proben

Am Ende einer Kultur oder bei einer Probennahme wurden die Zellen 5 Minuten bei 27 000 g (Sorvall RC-2 bzw. RC-5 oder Beckman J-21B bzw. J-21-C) oder mindestens 2 Minuten bei 5 000 Upm (Heraeus Christ Labofuge III) bei 4°C abzentrifugiert. Bei Bedarf wurden sie zweimal gewaschen.

2.3.4.2. Probennahme während einer Kinetik und Lagerung der Hefezellen

(nur bei kurzem zeitlichem Abstand der Probennahme und bei Aufschluß der Hefezellen mit Alcoa, s. Kapitel 2.3.5.2.)

Die Proben wurden nach der Entnahme sofort auf das gleiche Volumen Eis gegossen und bei 4°C aufbewahrt. Nach der Probennahme wurden die gekühlten Proben abzentrifugiert wie in Kapitel 2.3.4.1. beschrieben.

Die gekühlten Hefezellproben konnten für den Zellaufschluß einen Tag bei 4°C aufbewahrt werden.

2.3.4.3. Entnahme kleinerer Proben

Die Proben wurden sofort nach Entnahme 4 Minuten in Kunststoff-Reaktionsgefäßen (Eppendorf) bei 8 000 g (Eppendorf 5412) und 4°C abzentrifugiert.

Vor Durchführung von Bestimmungen im Kulturmedium wurden die Überstände in andere Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und noch einmal wie oben beschrieben zentrifugiert.

Mit Proben aus der überstehenden Lösung wurden die Bestimmungen durchgeführt.

2.3.5. Herstellung des Rohextrakts

2.3.5.1. Herstellung des Rohextrakts mit Glasperlen

Die Feuchthefe wurde in einem starkwandigen Reagenzglas (14 mm ∅) mit Glasperlen versetzt, bis die Hefe/Glasperlen-Mischung gerade noch leicht beweglich war. Dann wurde das Reagenzglas auf einem Vortex-Schüttler bei höchster Drehzahl geschüttelt, bis alle Zellen aufgeschlossen waren. Dies konnte mit Hilfe eines Lichtmikroskops leicht kontrolliert werden. In der Regel waren 1,5 bis 2,5 Minuten ausreichend.

Ein sauberer Aufschluß ist noch mit 20 mg Feuchthefe gut möglich. Die löslichen Zellbestandteile wurden mit 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,5, extrahiert (bei 20-50 mg Feuchthefe meist 1 ml Puffer). Glasperlen und Zelltrümmer wurden anschließend 5 Minuten bei 5000 Upm (Heraeus-Christ Labofuge) und 4°C abzentrifugiert. Der überstehende Rohextrakt wurde zur Aufbewahrung abdekantiert.

2.3.5.2. Herstellung des Rohextrakts mit Aluminiumoxid (Alcoa)

Ein Teil Feuchthefe wurde mit 3 Teilen Aluminiumoxid (Alcoa) versetzt und im Porzellanmörser kräftig zerrieben (30). Die Mischung wurde mit dest. H_2O oder mit 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,5, extrahiert, wobei die Zugabemenge von der gewünschten Konzentration des Rohextrakts abhing. Im allgemeinen wurden 6 Teile des Extraktionsmittels zugesetzt.

Alcoa und Zelltrümmer wurden anschließend 10 Minuten bei 27 000 g (Sorvall oder Beckman) und 4°C abzentrifugiert. Der überstehende Rohextrakt wurde zur Aufbewahrung abdekantiert.

2.3.5.3. Aufschluß von Hefezellen mit der French Press

Zellsuspensionen wurden zweimal bei 20 000 psi Innendruck durch die French Press (Aminco) passiert. Die Durchlaufgeschwindigkeit wurde so geregelt, daß die Lösung tropfenweise ausfloß. Durch zwischenzeitliche halbstündige Kühlung des Zylinders in der Gefriertruhe wurde erreicht, daß die Temperatur des Extrakts 30°C nie überstieg.

Zur Beseitigung der Zelltrümmer wurden die Extrakte 10 Minuten bei 27 000 g (Sorvall) und 4°C abzentrifugiert und der überstehende Rohextrakt zur Aufbewahrung abdekantiert.

2.3.6. Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt in Rohextrakten und Lösungen wurde nach der Methode von Lowry et al. (31) bestimmt.

2.3.7. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Eine Enzymeinheit (Unit, U) ist die Enzymmenge, die unter Standardbedingungen pro Minute die Umsetzung von 1 µmol Substrat oder eine entsprechende Anzahl von Zyklen einer bestimmten Reaktion katalysiert. Als Standardtemperatur wurde 25°C gewählt.

Die spezifische Aktivität ist definiert als die Anzahl von Enzymeinheiten pro Milligramm Protein.

Gemessen wurde immer im Eppendorf-Photometer (Netheler & Hinz) mit angeschlossenem Kompensationsschreiber (Netheler & Hinz). Die Schichtdicke in den Küvetten betrug 1 cm. Testtemperatur war 25°C.

2.3.7.1. Bestimmung der Aktivität der Malatdehydrogenase

Die Aktivität der MDH wurde nach Witt et al. (6) in Anlehnung an die Methode von Wolfe und Neilands (32) gemessen.

Testansatz: 1800 µl Glycin-Hydrazin-Puffer
100 µl L-Malat-Lösung (1 M, neutralisiert)
100 µl NAD^+-Lösung (5×10^{-2} M)

Die Reaktion wurde mit
x µl Enzymlösung gestartet und die Bildung von NADH bei 366 nm verfolgt.

Glycin-Hydrazin-Puffer: 75 g Glycin
52 g Hydrazinsulfat
2 g EDTA
40,8 g NaOH
mit dest. H_2O auf 800 ml aufgefüllt
mit konz. NaOH-Lösung auf pH 9,5 titriert
mit dest. H_2O auf 1000 ml aufgefüllt.

Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf den Gehalt der Stammlösungen.

Der Extinktionskoeffizient von NADH beträgt bei 366 nm $3{,}3 \times 10^6$ $cm^2 \times mol^{-1}$.

2.3.7.2. Bestimmung der Aktivität der Fructose-1,6-bisphosphatase

Die Aktivität der FBPase wurde nach Bergmeyer (33a) gemessen.

Testansatz:
- 200 µl Tris-HCl-Puffer (1 M, pH 7,5)
- 40 µl $MgCl_2$-Lösung (0,5 M)
- 100 µl $NADP^+$-Lösung (10 mM)
- 240 µl Mercaptoäthanol-Lösung (0,2 M)
- 40 µl Phosphoglucoseisomerase-Lösung (Boehringer, 0,5 mg/ml, 1:4 mit Puffer verdünnt)
- 40 µl Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Lösung (Boehringer, 0,5 mg/ml, 1:2 mit Puffer verdünnt)
- 1220-x µl dest. H_2O
- x µl Enzymlösung

Die Reaktion wurde mit
- 20 µl Fructose-1,6-bisphosphat-Lösung (50 mM)

gestartet und die Bildung von NADPH bei 334 nm verfolgt.

Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf den Gehalt der Stammlösungen, wenn nicht anders angegeben.

Der Extinktionskoeffizient von NADPH beträgt bei 334 nm 6×10^6 $cm^2 \times mol^{-1}$.

2.3.8. Bestimmung von Metaboliten

Die Bestimmung von Glucose erfolgte nach Bergmeyer (33b). Die Bestimmung von Glucose-6-phosphat erfolgte nach Bergmeyer (33c).

2.3.9. Chromatographische Methoden

2.3.9.1. Abtrennung von Glucose aus Inaktivierungsmedium mit Hilfe eines Ionenaustauschers

Das Inaktivierungsmedium wurde mit Ameisensäure bis zu einer Endkonzentration von 0,2 M versetzt und mit Salzsäure auf pH 2,35 titriert. 15 ml der so vorbereiteten Lösung wurden auf eine Säule (Pasteur-Pipette) aufgetragen, die mit Dowex 50 WX 4 (äquilibriert in 0,2 M HCOOH - pH 2,35) gefüllt war. Der Ionenaustauscher wurde etwa bis zur Hälfte seiner Kapazität beladen.

Nach dem Auftragen wurde mit 50 ml bidest. H_2O gewaschen.

Glucose wird als ungeladenes Molekül von Ionenaustauschern nicht gebunden, läuft also während Auftragung und Waschvorgang durch, während alle bei dem gewählten pH-Wert positiv geladenen Moleküle gebunden werden. Zur Elution dieser Bestandteile des Inaktivierungsmediums wurde mit 0,2 M Pyridiniumformiat-Puffer, pH 4,5, gewaschen.

2.3.9.2. Dextranblau-Sepharose-Säulenchromatographie

Die Isoenzyme der Hefe wurden in Anlehnung an die Methode von Hägele (34) und Nauhaus (20) getrennt.

Rohextrakte mit MDH-Aktivitäten bis zu ca. 500 U wurden bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 15 ml/h auf Säulen (2 x 2 cm) aufgetragen, die mit Dextranblau-Sepharose (äquilibriert mit 20 mM Kaliumphosphat-Puffer, 1 mM EDTA, 1 mM Mercaptoäthanol, pH 7,0) gefüllt waren. Dextranblau-Sepharose war nach einer von Hägele (34) modifizierten Methode von Ryan und Vestling (35) hergestellt.

Nach der Auftragung wurde mit 100 ml des oben genannten Puffers gewaschen.Die Elution der cytoplasmatischen MDH erfolg-

te durch Waschen mit 20 mM Kaliumphosphat-Puffer, 3 mM NADH, 1 mM EDTA, 1 mM Mercaptoäthanol, pH 7,0.

Die Elution der mitochondrialen MDH erfolgte nach weiterem Waschen (20 mM Kaliumphosphat-Puffer, 1 mM EDTA, 1 mM Mercaptoäthanol, pH 7,0) mit 20 mM Kaliumphosphat-Puffer, 2 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Mercaptoäthanol, pH 7,0).

2.3.9.3. Dünnschichtchromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie von Kulturmedium und löslichen Zellbestandteilen wurden mit Kieselgel ohne Fluoreszenzindikator beschichtete DC-Karten SI (Riedel-de-Haen) sowie mit Kieselgel 60 F_{254} beschichtete Glasplatten (Merck) verwendet.

Trennungen nach dieser Methode wurden in Chromatographiekammern als aufsteigende Chromatogramme entwickelt.

Als Laufmittel wurden verwendet:
A: n-Butanol/Eisessig/dest. H_2O im Verhältnis 67:17:17
B: n-Butanol/Eisessig/Pyridin/dest. H_2O im Verhältnis 30:6:24:20

Als Referenzsubstanz wurde L-Leucin aufgetragen.

Die Platten wurden nach Beendigung der Chromatographie getrocknet, zum Nachweis von Aminosäuren und Peptiden mit Ninhydrinreagenslösung (Merck) besprüht und 15 Minuten bei 110°C entwickelt.

2.3.10. Elektrophoretische Methoden

2.3.10.1. Disc-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Disc-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen wurden nach Davis (36) und Ornstein (37) mit dem bei Maurer (38) als 1a bezeichneten System durchgeführt, in Anlehnung daran auch mit 5- und mit 10-prozentigem Trenngel.

Entsprechend der Bedienungsanleitung (39) für das verwendete Plattengel-Elektrophoresegerät (Ultraphor, Colora) wurde ein 10fach konzentrierter Elektrodenpuffer, pH 8,3, verwendet, um den Spannungsabfall zwischen Elektroden und Gelenden gering zu halten.

In der vorliegenden Arbeit wurden analytische Trennkammern eingesetzt, die die gleichzeitige Elektrophorese auf maximal drei 2 mm starken Gelen unter identischen Bedingungen erlaubten.

Die aufzutrennendenProben wurden mit Glycerin (Endkonzentration 20 %) und Bromphenolblau (Endkonzentration 0,002 %) versetzt. Mit Hilfe des Glycerins konnten die Proben dem in die Probentaschen eingefüllten, 1:8 verdünnten Sammelgelpuffer unterschichtet werden. Das Bromphenolblau diente zur Markierung der Front während der Elektrophorese.

Die Elektrophorese wurde bei 0°C und konstanten Spannungen von 100 V während des Sammellaufs und 300 V während der Trennung durchgeführt. Zur Kühlung diente der Kryomat TK 30 D (mgw Lauda), zur Stromversorgung das Netzgerät HNs 1200-02 (Heinzinger).

2.3.10.2. SDS-Disc-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Bei SDS-Disc-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen nach Laemmli (40) war das verwendete System mit dem der Disc-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen (s. Kapitel 2.3.10.1.) identisch,

jedoch enthielten Sammelgel und Trenngel sowie Elektrodenpuffer und Puffer zum Überschichten der Proben 0,1 % SDS.

Die mit SDS (Endkonzentration 0,1 %) versetzten Proben wurden 5 Minuten im kochenden Wasserbad inkubiert (41,42,43). Nach Abkühlen wurden Glycerin (Endkonzentration 20 %) und Bromphenolblau (Endkonzentration 0,002 %) zugesetzt und die Proben wie unter 2.3.10.1. beschrieben aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei 20°C und bei konstanten Spannungen von 100 V während des Sammellaufs und 300 V während der Trennung durchgeführt. Kühlung und Stromversorgung s. Kapitel 2.3.10.1.

2.3.10.3. Papierelektrophorese

Die aufzutrennenden Proben wurden im Abstand von je 4 cm in der Mitte des Elektrophoresepapiers (Schleicher & Schüll, 28 x 21 cm) aufgetragen. Die Trocknung erfolgte entweder im kalten Luftstrom oder im Vakuum in einer für diesen Zweck hergestellten Trockenkammer. Das Elektrophoresepapier wurde nach der Auftragung der Proben so im Elektrophoresepuffer getränkt, daß die Mitte des Papiers mit den Proben gerade noch trocken blieb. Überschüssiger Elektrophoresepuffer wurde mit Papiertüchern aufgesaugt und das Elektrophoresepapier sofort in die Elektrophoresekammer (Shandon) eingelegt. Die Elektrophorese wurde bei Zimmertemperatur und einer konstanten Stromstärke von 8 mA durchgeführt. Die Spannung fiel während des 2- bis 2,5-stündigen Laufs von ca. 280 V auf ca. 160 V. Zur Stromversorgung diente das Netzgerät HNs 1200-02 (Heinzinger).

Als Elektrophoresepuffer wurde verwendet:
Saures System: 1,5 % HCOOH
1,0 % CH_3COOH
in dest. H_2O

Als Referenzsubstanz wurde L-Leucin aufgetragen.

Das Elektrophoresepapier wurde nach Beendigung des Laufs im Luftstrom getrocknet, zum Nachweis von Aminosäuren und Peptiden mit Ninhydrinreagenslösung (Merck) besprüht und 10 bis 15 Minuten bei 110°C entwickelt.

2.3.11. Proteinanfärbung nach der Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Proteine in den Polyacrylamidgelen wurden nach dem Verfahren von Weber und Osborn (44) angefärbt. Die Gele wurden 1,25 Stunden in eine 0,25-prozentige Lösung von Coomassie Blue in Methanol/Eisessig/dest. H_2O (227/46/227, v/v/v) gelegt. Der nicht an Protein gebundene Farbstoff wurde anschließend durch Diffusion in eine mehrmals ausgetauschte Lösung von Methanol/Eisessig/dest. H_2O (500/750/8750, v/v/v) entfernt.

2.3.12. Einengen von Kulturmedium

Kulturmedien wurden entweder in Ultrafiltrationszellen (Amicon) mit 2,5 atü Stickstoff (99,99 %) über Ultrafiltrationsmembranen (Berghof) konzentriert oder lyophilisiert (WKF LO5) und wieder in einem kleinen Volumen dest. H_2O bzw. Elektrophoresepuffer aufgenommen.

2.3.13. Bestimmung der Zelldichte

2.3.13.1. Auszählen mit der Neubauer-Kammer

Aliquots der Hefekulturen wurden 1:10 verdünnt und Proben hiervon in der Neubauer-Kammer ausgezählt (mindestens 10 x 16 Felder). Aus dem definierten Volumen der Kammer und dem Ergebnis der Auszählung konnte die Zellzahl pro ml Kultur errechnet werden.

2.3.13.2. Auszählen der lebensfähigen Zellen ("viable counts")

Zur Bestimmung der lebensfähigen Zellen wurden nach Auszählen in der Neubauer-Kammer (s. Kapitel 2.3.13.1.) Aliquots der Hefekulturen in drei Schritten so verdünnt, daß pro ml der größten Verdünnung zwischen 1000 und 2000 Zellen erhalten wurden. Von jeder dieser Verdünnungen wurden 0,3 ml auf 3 Agarplatten (s. Kapitel 2.3.2.1.a) verteilt und mit einem gebogenen Glasstab ausgestrichen. Nach Eindiffundieren der aufgetragenen Suspensionen in den Nähragar wurden die Platten umgedreht, in Tüten verpackt und 48 Stunden bei 29°C bebrütet. Anschließend wurden die Zellkolonien gezählt.

Zur Verringerung des beim Verdünnen und Pipettieren auftretenden Fehlers wurde das oben beschriebene Verfahren bei jeder Hefekultur 3fach durchgeführt.

Alle Verdünnungen wurden mit sterilem dest. H_2O und alle Arbeitsgänge unter sterilen Bedingungen und mit sterilisierten Geräten ausgeführt.

2.3.13.3. Relativbestimmung der Zelldichte durch Trübungsmessung

a) Aliquots der Hefekulturen wurden 1:15 verdünnt und die Extinktion der Verdünnung im Photometer (Eppendorf oder Shimadzu) bei 578 nm gemessen (je nach Versuch gegen dest. H_2O oder gegen das entsprechende Kulturmedium).

b) Zur Messung des Zellwachstums ohne Probenentnahme wurden Hefekulturen in Erlenmeyerkolben gezogen, die über einen Stutzen am Hals des Kolbens sowie ein Schlauchverbindungsstück fest mit einer runden Meßküvette verbunden waren. Zur Messung der Zelldichte wurde die Kultur in diese Meßküvette eingefüllt und die Trübung sofort in einem Klett-Photometer (Klett-Summerson) gemessen.

2.3.14. Eingriffe in den Stoffwechsel der Hefezellen

2.3.14.1. Eingriff während der Derepression mit Cycloheximid

Je nach Versuchsführung wurde die Derepression der Hefe auf unterschiedliche Weise mit Cycloheximid beeinflußt:

a) Cycloheximid wurde zu Beginn der Derepressionskultur zugesetzt.

b) Die für die Derepressionskultur vorgesehene Hefe wurde in 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,5, in dem Cycloheximid gelöst war, suspendiert und 20 Minuten bei 29°C geschüttelt. Die Hefe wurde nach dieser Vorinkubation abzentrifugiert und in Derepressionsmedium resuspendiert, in dem wiederum Cycloheximid gelöst war. Sodann wurde die Kultur wie bei der Derepression üblich weitergeführt.

c) Cycloheximid wurde während der Derepression zugesetzt.

Die Konzentration an Cycloheximid war jeweils 10 µg/ml entsprechend 38 µM.

2.3.14.2. Eingriff während der Inaktivierung mit Cycloheximid

Nach Überführen der Hefe aus der Derepressionskultur in das entsprechende Volumen 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,5, in dem Cycloheximid gelöst war, wurde die Suspension 10 Minuten bei 29°C geschüttelt. Nach dieser Vorinkubation wurde die für die Inaktivierung benötigte Menge Glucose zugegeben und wie bei der Inaktivierung üblich fortgefahren.

Die Konzentration an Cycloheximid war 5 µg/ml entsprechend 19 µM.

2.3.15. Radioisotopenmarkierung und -messung

^{3}H- oder ^{14}C-markiertes L-Leucin wurde den Hefekulturen zugesetzt.

Je nach Markierungsgrad wurden 50 bis 500 µl der wäßrigen Proben in 10 ml Szintillator im Flüssigszintillationszähler (Berthold) gezählt.

Szintillator für wäßrige Proben:

650 ml Toluol
350 ml Triton X 100
3 g PPO
75 mg POPOP

In demselben Szintillator wurde ^{14}C-markiertes CO_2 ausgezählt, das an mit Hyamine-Lösung getränkte Filterpapierdochte gebunden war.

Papierstreifen von Papierelektropherogrammen wurden in Szintillationsgläschen mit je 0,4 ml reinen Toluol-Szintillators (4 g PPO, 0,1 g POPOP pro Liter Toluol) befeuchtet und ausgezählt.

Im reinen Toluol-Szintillator wurden auch Filterpapierblättchen mit gefälltem Protein (s. Kapitel 2.3.16.2.) ausgezählt.

2.3.16. Bestimmung des Einbaus von Radioisotopen in Protein

2.3.16.1. Bestimmung nach einer selbst entworfenen Methode

200 µl Rohextrakt wurden mit 200 µl 20-prozentiger TCA (w/v) versetzt und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mindestens 60 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen. Anschließend wurde 4 Minuten bei 8000 g zentrifugiert (Eppendorf). Der Überstand wurde abgenommen (TCA-löslicher Anteil). Der Niederschlag wurde durch Aufschlämmen und wieder Abzentrifugieren zweimal mit je 400 µl 10-prozentiger TCA (w/v), dann mit 200 µl Äthanol/Diäthyläther (1:1, v/v) gewaschen, bei 56°C (Eppendorf-Thermostat) getrocknet und in 200 µl 1 N NaOH gelöst (TCA-fällbarer Anteil).

Der TCA-lösliche Anteil konnte sofort ausgezählt werden, beim TCA-fällbaren Anteil mußte damit bis zum Abklingen der Chemolumineszenz gewartet werden.

2.3.16.2. Bestimmung nach der Methode von Mans und Novelli (45)

Aliquots von je 20 µl Rohextrakt wurden auf Filterpapierblättchen (Whatman 3 MM, 23 mm Durchmesser) aufgebracht und im Luftstrom getrocknet. Jedes Blättchen wurde separat in ein Bechergläschen mit 3 ml eiskalter 10-prozentiger TCA (w/v), 0,1 M an L-Leucin, gelegt und mindestens 60 Minuten in der Kälte stehengelassen. Die folgenden Wasch- und Extraktionsvorgänge wurden durch Abpipettieren der ersten und Zugabe der nächsten Lösung durchgeführt:

- Waschen: 15 Minuten in 3 ml 5-prozentiger TCA (w/v) stehen lassen
- Extraktion von RNA: 30 Minuten bei 90°C in 3 ml 5-prozentiger TCA (w/v) inkubieren
- Waschen: in 3 ml 5-prozentiger TCA (w/v)

- Extraktion von TCA und Lipiden: mindestens 30 Minuten bei 37°C in 3 ml Äthanol/Diäthyläther (1:1, v/v)
- Extraktion von Lipiden: mit 3 ml Äthanol/Diäthyläther (1:1, v/v)
- Extraktion von Wasser und Äthanol: 15 Minuten bei Zimmertemperatur in ausreichend Diäthyläther stehen lassen
- Extraktion der noch verbliebenen polaren Lösungsmittel: mit 3 ml Diäthyläther

Die Blättchen wurden an der Luft getrocknet und ausgezählt.

2.3.17. Autoradiographie

Autoradiogramme wurden von Dünnschichtchromatographie-Platten und von Polyacrylamidgelen angefertigt.

Die DC-Platten müssen vor Auflegen der Filme völlig trocken sein. Die Polyacrylamidgele wurden auf Filterpapier aufgelegt und in einer für diesen Zweck gebauten Kammer unter Ölvakuum getrocknet. Das auf dem Filterpapier haftende getrocknete Gel wurde mit Klebeband auf einer Glasplatte befestigt.

Auf die so vorbereiteten DC-Platten bzw. Polyacrylamidgele wurden in der Dunkelkammer in passender Größe Röntgenfilme (Agfa Curix) aufgelegt und mit Klebeband befestigt. Diese Anordnung wurde lichtdicht verpackt und zur Exposition (bei 4°C) kräftig beschwert. Nach beendeter Exposition wurden die Filme entwickelt.

3. ERGEBNISSE

Bei den im folgenden dargestellten Ergebnissen werden die Versuchsführung und direkt sich aus den Befunden ergebende Fragen im Zusammenhang der jeweiligen Kapitel diskutiert. Die Einordnung und Wertung der Ergebnisse wird in dem anschließenden Diskussionsteil vorgenommen.

3.1. Derepression und Inaktivierung

Unter Derepression wird die Aufhebung der Repression der Enzymsynthese verstanden. Bei Kultivierung der Hefe in Medien, bei denen als Kohlenstoffquelle C_2- oder C_3-Körper wie Äthanol, Acetat, Pyruvat oder Glycerin zur Verfügung stehen, werden neben anderen die Enzyme des Glyoxylat-Zyklus und der Gluconeogenese: Isocitrat-Lyase, Malat-Synthase und cytoplasmatische Malat-Dehydrogenase sowie Phosphoenolpyruvat-carboxykinase und Fructose-bisphosphatase neu synthetisiert. Eine ausführliche Diskussion findet sich bei Hägele (34).

Die Derepression und Inaktivierung der glucose-sensitiven Enzyme wurde am Beispiel der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase in der Hefe Saccharomyces cerevisiae M 1 untersucht.

3.1.1. Zur Wahl des Organismus

Der Stamm Saccharomyces cerevisiae M 1 (26) wurde von Neeff (14) als für die Untersuchung von Derepression und Inaktivierung besonders geeignet charakterisiert. Die Derepression ist unter bestimmten Kulturbedingungen sehr stark, es

werden also große Enzymmengen synthetisiert. Dies führt wiederum bei der Inaktivierung zu ausgeprägten Effekten.

3.1.2. Verlauf der MDH-Aktivität bei Derepression und Inaktivierung

Die Derepression und Inaktivierung der cytoplasmatischen MDH wurde wie in der Literatur beschrieben sowohl in Minimalmedium / Minimalmedium mit Glucose (6,15,17,19) als auch in Minimalmedium / Puffer mit Glucose (14,20) durchgeführt. Das Umsetzen der Hefezellen nach der Derepression in Puffer ohne Zusatz aller Nährsubstrate diente zur Untersuchung der Inaktivierung unter weitgehender Ausschaltung des Zellwachstums.

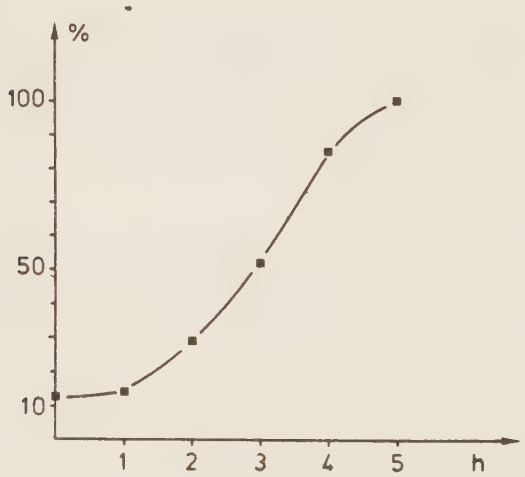

Abbildung 1: Derepression der MDH in Minimalmedium

Versuchsdurchführung wie in 2.3.3.5. beschrieben. Die Aktivität der MDH wurde nach 2.3.7.1. bestimmt.

Bei der Derepression erhöht sich die spezifische MDH-Aktivität in 5 Stunden durchschnittlich um den Faktor 8 (Abbildung 1). Dies stimmt mit den früheren Beobachtungen überein.

Die Inaktivierung in Minimalmedium wird durch Zugabe von Glucose zu dereprimierten Hefezellen ausgelöst. Für die Inaktivierung in Puffer wurden die dereprimierten Zellen abzentrifugiert, gewaschen und in Puffer suspendiert, anschließend wurde Glucose zugesetzt.

Aus einer großen Zahl von Versuchen zeigt sich, daß die Inaktivierung in Minimalmedium in der ersten Stunde nach Glucosezugabe stärker ist als die Inaktivierung in Puffer (Abbildung 2). Neeff (14) hatte keinen Unterschied festgestellt.

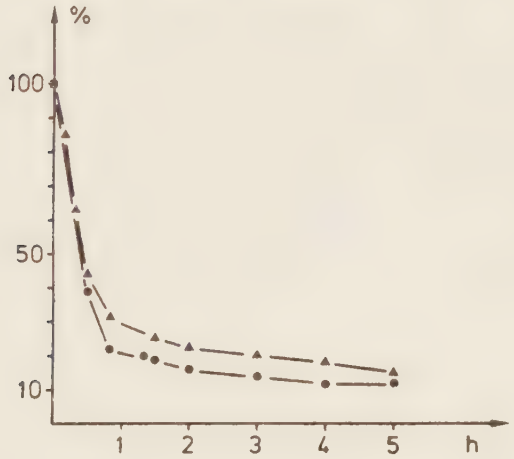

Abbildung 2: Inaktivierung der MDH

Nach fünfstündiger Derepression wurde die Inaktivierung durch Zugabe von Glucose ausgelöst. Versuchsdruchführung wie in 2.3.3.6. beschrieben. Die Aktivität der MDH wurde nach 2.3.7.1. gemessen. (●) Inaktiv. in Minimalmedium, (▲) Inaktivierung in Puffer.

Als Erklärung für den - allerdings nicht sehr großen - Unterschied kommen eine Abkühlung der Zellen beim Abzentrifugieren und/oder eine kurze lag-Phase, bedingt durch die Umstellung auf das veränderte Kulturmedium, in Frage. Eine grundsätzlich unterschiedliche Inaktivierungskinetik in den beiden Medien ist nicht festzustellen. In beiden Fällen nimmt die MDH-Aktivität nach einer ausreichend langen Inaktivierungsdauer (vier bis fünf Stunden) wieder in etwa auf den Wert ab, der vor der Derepression in der Hefe vorlag und dem mitochondrialen Isoenzym zuzuordnen ist (20) (im Mittel 13 % des dereprimierten Wertes).

3.1.3. Fructose-bisphosphatase-Aktivität

Zum Vergleich und zur Kontrolle der Inaktivierung in Puffer wurde neben der MDH-Aktivität auch die FBPase-Aktivität gemessen. Die FBPase unterliegt nach (46,8,47,9) wie die c-MDH der glucose-induzierten Repression und Inaktivierung (17).

Die spezifische Aktivität dieses Enzyms sinkt innerhalb 4 Stunden nach Glucosezugabe auf 12 % des dereprimierten Wertes ab (Tabelle 1). Die Inaktivierung der FBPase gelingt also ebenfalls unter den in dieser Versuchsführung gewählten Bedingungen.

Tabelle 1: Inaktivierung der FBPase in Puffer
Die Aktivität der FBPase wurde nach 2.3.7.2. gemessen

Zeit nach Zugabe von Glucose	Spezifische FBPase-Aktivität
0	100 %
3,5 h	16 %
4 h	12 %

3.1.4. Glucoseverbrauch bei der Inaktivierung

Als grober Gradmesser der Stoffwechselaktivität der Hefe unter den gewählten Bedingungen der MDH-Inaktivierung wurde der Glucoseverbrauch bestimmt.

Der Glucoseverbrauch bei der Inaktivierung in Minimalmedium ist während des betrachteten Zeitraums praktisch linear (Abbildung 3). Das einsetzende Zellwachstum führt offensichtlich in diesem Zeitraum noch nicht zu einer deutlichen Erhöhung des Glucoseumsatzes. Dagegen nimmt der Glucoseverbrauch bei der Inaktivierung in Puffer im Lauf der Zeit ab. Die Verringerung des Glucoseverbrauchs spiegelt die Verlangsamung der gesamten Stoffwechselaktivität wider, die durch das Fehlen einer exogenen Stickstoffquelle hervorgerufen wird.

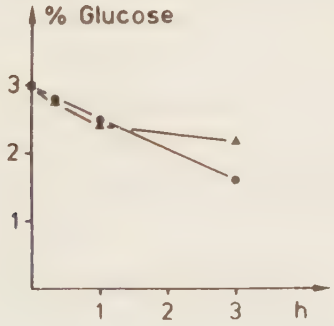

Abbildung 3: Glucoseverbrauch während der Inaktivierung

Der Glucosegehalt im Kulturmedium während der Inaktivierung in Minimalmedium (●) und in Puffer (▲) wurde nach 2.3.8. bestimmt.

In den beiden folgenden Kapiteln 3.1.5. und 3.1.6. wird untersucht, wie sich der Gehalt der Zellen an löslichen Proteinen sowie die Zellzahl unter den verschiedenen Kulturbe-

dingungen entwickeln. Diese Werte müssen bekannt sein, um die Kinetik der spezifischen MDH-Aktivität tatsächlich als "Derepression und Inaktivierung" verifizieren zu können.

3.1.5. Proteinbiosynthese während Derepression und Inaktivierung

Mit Hilfe von Glasperlen oder mit der French Press können annähernd 100-prozentige Aufschlüsse der Hefezellen erreicht werden. Damit ist auch eine quantitative Bestimmung des Gehalts an löslichen Proteinen leicht möglich.

Aus den Experimenten mit Glasperlenaufschlüssen ergibt sich, daß der Proteingehalt der Zellen während 5 Stunden Derepression auf das 1,4-fache zunimmt (Abbildung 4). In guter Übereinstimmung damit steht der Befund bei Aufschluß mit der French Press, wo man eine Zunahme auf das 1,3-fache findet (in der Abbildung nicht gezeigt).

Bei fortgesetzter Derepressionskultur wird zunächst eine Abflachung der Proteinzunahme beobachtet. Erst nach längeren Derepressionszeiten (ca. 10 Stunden) nimmt der Proteingehalt wieder deutlicher zu.

Die Zunahme des Proteingehalts während der ersten fünf Stunden auf Minimalmedium ist verknüpft mit der Derepression der Enzyme des Glyoxylatzyklus und der Gluconeogenese, d.h. mit einer Proteinsyntheseleistung der Zellen.

Eine wesentliche Erhöhung der Aktivität dieser Enzyme findet nach Ablauf von fünf Stunden nicht mehr statt, wozu die beobachtete Abflachung der Proteinzunahme gut paßt.

Zugabe von Glucose zum Minimalmedium der dereprimierten Kulturen bewirkt eine exponentielle Zunahme des Proteingehalts der Kultur, unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe (Abbildung 4). Unter diesen Bedingungen (leicht verwertbare

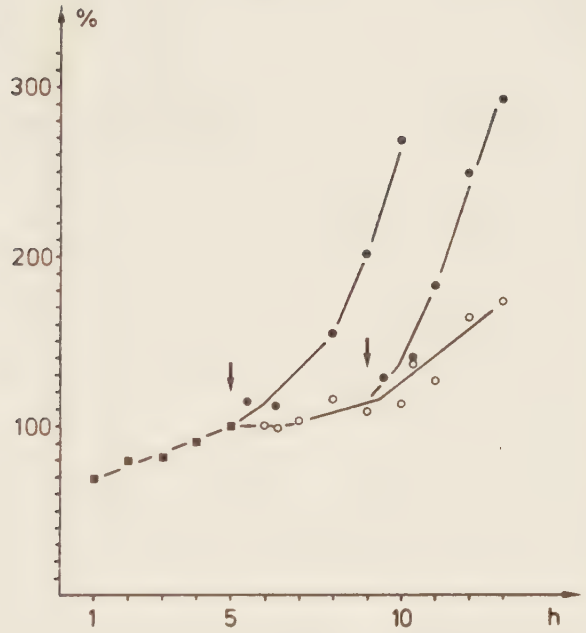

Abbildung 4: Proteingehalt der Hefezellen während der Derepression und während der Inaktivierung in Minimalmedium

Die Zellen wurden mit Glasperlen aufgeschlossen (Kapitel 2.3.5.1.) und der Proteingehalt mit der Methode nach Lowry et al. (31) bestimmt. (■) Derepression, (●) Inaktivierung, (o) fortgeführte Derepressionskultur = Kontrolle ohne Glucose, (→) Zugabe von Glucose.

Kohlenstoffquelle Glucose sowie Stickstoffquelle in ausreichender Menge) setzt Zellwachstum ein (s. Kapitel 3.1.6.).

Dagegen nimmt der Proteingehalt nicht exponentiell, sondern nur linear zu, wenn zu einer dereprimierten Kultur nach Umsetzen auf Puffer Glucose gegeben wird (Abbildung 5). Der

Anstieg der Proteinzunahme ist hierbei etwas größer als bei der vorangegangenen Derepression in Minimalmedium. Unter diesen Bedingungen steht zwar ausreichend Glucose zur Verfügung, jedoch keine exogene Stickstoffquelle, so daß Proteinsynthese und Wachstum durch die Größe des endogenen Stickstoffpools limitiert sind (s. auch Kapitel 3.1.6.).

Keine Veränderung des Proteingehalts ergibt sich nach Umsetzen einer dereprimierten Kultur auf Puffer allein, was ohne Vorhandensein einer Kohlenstoff- und einer Stickstoffquelle auch zu erwarten ist (Abbildung 5).

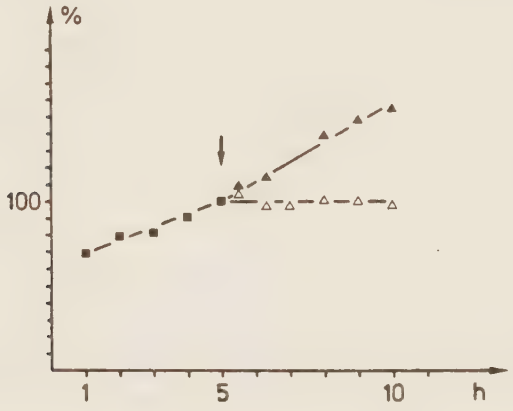

Abbildung 5: Proteingehalt der Hefezellen während der Inaktivierung in Puffer

Die Zellen wurden mit Glasperlen aufgeschlossen (Kapitel 2.3.5.1.) und der Proteingehalt mit der Methode nach Lowry et al. (31) bestimmt. (▲) Inaktivierung, (△) Kontrolle ohne Glucose, (→) Zugabe von Glucose.

3.1.6. Zelldichte bei Derepression und Inaktivierung

Die Zelldichte der Kulturen wurde während Derepression und Inaktivierung mit drei verschiedenen Methoden bestimmt: relativ durch Trübungsmessung mit dem Photometer, absolut durch Auszählen mit der Neubauer-Kammer und nach der "viable counts"-Methode (Kultivierung verdünnter Zellsuspensionen auf Agarplatten und Auszählen der aus lebensfähigen Zellen entstandenen Kolonien).

Während der Derepression findet unter den gewählten Bedingungen nach Neeff (14) keine Zellvermehrung statt. Dies kann mit Neubauer-Kammer und viable counts bestätigt werden (Tabelle 2). Die Zellzahl nimmt eher geringfügig ab. (Trübungsmessung wurde für den Zeitraum der Derepression nicht durchgeführt.)

Tabelle 2: Zelldichte während der Derepression und während der Inaktivierung in Minimalmedium bzw. in Puffer
Bestimmung mit Neubauer-Kammer und "viable counts"-Methode

	Zelldichte bezogen auf 5-h-Derepressions-Wert	
	Neubauer-Kammer	Viable counts
Beginn Derepression	115 %	122 %
5 h Derepression	100 %	100 %
2 h Inaktivierung in Minimalmedium	180 %	174 %
2 h Kontrolle in Minimalmedium	114 %	126 %
2 h Inaktivierung in Puffer	104 %	112 %
2 h Kontrolle in Puffer	98 %	-

Nach Zugabe von Glucose zu dereprimierten Zellen in Minimalmedium wird mit allen drei Methoden eine starke Zunahme der Zelldichte beobachtet (Tabelle 2 und Abbildung 6). Die Zunahme liegt je nach verwendeter Meßmethode zwischen 35 und 60 % in 90 Minuten, während sie bei (14) für diesen Zeitraum mit nur 10 bis 15 % beziffert wurde. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Beobachtungen bietet sich nicht an.

Dagegen steigt die Zelldichte bei Belassen der Zellen auf Minimalmedium ohne Glucose nach allen drei Methoden nur geringfügig an.

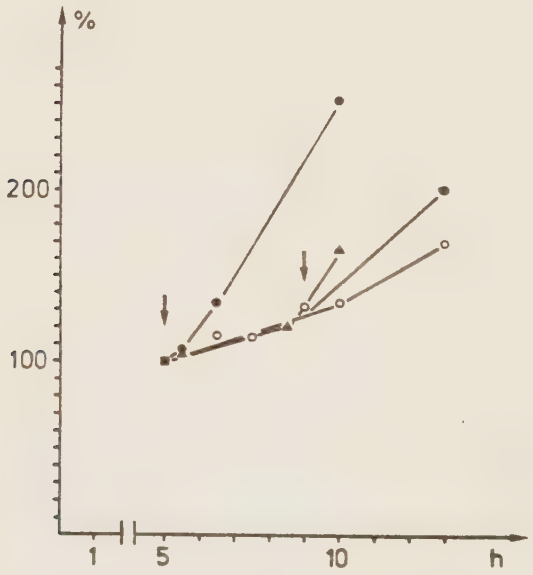

Abbildung 6: Zelldichte während der Inaktivierung in Minimalmedium und in Puffer

Die Zelldichte wurde durch Trübungsmessung mit dem Photometer bestimmt. (●) Inaktivierung in Minimalmedium, (○) Kontrolle in Minimalmedium ohne Glucose, (▲) Inaktivierung in Puffer, (△) Kontrolle in Puffer ohne Glucose, (→) Zugabe von Glucose.

Umsetzen dereprimierter Zellen auf Puffer und Zugabe von Glucose resultiert in einer geringfügigen Zunahme der Zelldichte (Tabelle 2 und Abbildung 6); auf Puffer allein verändert sich die Zellzahl nicht.

Ein Vergleich der Ergebnisse der Kapitel 3.1.5. und 3.1.6. ergibt folgendes Bild:

- Bei Verfolgung der Zelldichte über Trübungsmessung ist eine fast deckungsgleiche Entwicklung von Proteingehalt und Zelldichte für alle untersuchten Kultivierungsarten zu beobachten, mit Ausnahme der Glucosezugabe zu einer 9 Stunden alten Derepressionskultur, wo die Zelldichte mit der Proteinzunahme nicht ganz Schritt hält.
- Bei Messung der Zelldichte über die Absolutmethoden ist die Übereinstimmung zwischen Proteingehalt und Zelldichte nicht so ausgeprägt. Bei den Kulturen auf Minimalmedium ist qualitativ die Parallelentwicklung gut zu erkennen. Bei der Inaktivierung auf Puffer werden geringere Steigerungen der Zelldichte als des Proteingehalts beobachtet, bei der Kontrolle (Puffer ohne Glucose) herrscht wiederum Übereinstimmung.

Insgesamt läßt sich eine gute Korrelation zwischen Proteingehalt und Zelldichte feststellen.

Die beobachtete Zunahme des Gehalts an löslichen Proteinen sowie der Zellzahl nach Umsetzen auf glucosehaltiges Kulturmedium bewirkt allein nicht die rapide Abnahme der spezifischen Enzymaktivität (durch Ausverdünnen nach Repression der Enzymsynthese). Bei der beobachteten Kinetik handelt es sich also tatsächlich um eine Inaktivierung der Enzymaktivität.

3.2. Proteinturnover und Stoffwechsel der Hefe

3.2.1. Vorbemerkungen

Zur Messung des Proteinturnovers unter Derepressions- und Inaktivierungsbedingungen erschien die Markierung des Proteins mit radioaktivem L-Leucin aus zwei Gründen sinnvoll. Zum einen wurde davon ausgegangen, daß Leucin in Hefe in relativ geringem Maße verstoffwechselt wird, so daß der nicht zur Proteinmarkierung gelangende Anteil der zugegebenen Radioaktivitätsmenge klein sein sowie die Handhabung von radioaktiven Zellkulturen vergleichsweise unproblemtisch sein sollte. Zum anderen enthält die c-MDH, die als Vertreter der nach dem Repressions-Inaktivierungs-Modell inaktivierbaren Enzyme ausgewählt wurde, nach (34,48) Leucin als zweithäufigste Aminosäure nach Asparaginsäure, so daß eine relativ hohe Markierung dieses Enzyms erreicht werden konnte.

3.2.2. Degradation von Protein während der Inaktivierung

Wie schon erwähnt, lassen sich mit Hilfe von Glasperlen annähernd 100-prozentige Aufschlüsse der Hefezellen erreichen. Damit ist es möglich, von einem Aliquot der Hefekultur, das aufgeschlossen wurde, auf den Gehalt der gesamten Kultur an löslichem Protein und an niedermolekularen Anteilen zu schließen. Durch Messung der Radioaktivitäten von TCA-fällbaren und TCA-löslichen Anteilen der Rohextrakte markierter Zellen sind Aussagen über Proteinturnover-Vorgänge in den Zellen möglich. Die Degradation von Protein kann über die Abnahme der Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils verfolgt werden. Bei Pulse-Experimenten (Zugabe von radioaktivem Leucin über einen bestimmten Zeitraum) kann bei Proteinabbau die beobachtete Abnahme der Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils kleiner ausfallen als der Wirklichkeit

entspricht, da ein Teil der freigesetzten Aminosäuren (und damit auch ein Teil der markierten Aminosäure) wieder in gleichzeitig neusynthetisiertes Protein eingebaut werden kann. Bei Pulse-Chase-Experimenten (Zugabe von radioaktivem Leucin über einen bestimmten Zeitraum; Umsetzen der Zellen auf Medium mit großem Überschuß an unmarkiertem Leucin) wird dieser Fehler verringert oder im Idealfall (ungehinderter Austausch freier Aminosäuren) völlig vermieden.

Werden die Zellen mit Aluminiumoxid (Alcoa) aufgeschlossen, erhält man unterschiedliche Aufschlüsse mit wechselndem Prozentsatz an aufgebrochenen Zellen. Eine Berechnung der gesamten Menge an Protein, löslichen Anteilen oder der zugehörigen Radioaktivität in der gesamten Kultur ist aus diesen Rohextrakten nicht möglich. Als Ausweg verbleibt in diesem Fall, die Radioaktivitäten auf den jeweiligen Proteingehalt des Aufschlusses zu beziehen, also spezifische Radioaktivitäten zu errechnen. Eine Abnahme der spezifischen Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils kann in diesem Fall durch Abnahme des radioaktiv markierten Proteins durch Degradation oder/und durch Zunahme des unmarkierten Proteins durch Proteinneusynthese zustandekommen.

In den folgenden Abschnitten werden die Radioaktivitäten der TCA-fällbaren Anteile, der löslichen Anteile und der Medien der gesamten Kultur jeweils als Gesamt-Radioaktivitäten bezeichnet, die Werte der TCA-fällbaren und -löslichen Anteile wurden aus Glasperlenaufschlüssen erhalten, sofern nicht ausdrücklich anders angegeben.

Spezifische Radioaktivitäten wurden sowohl bei Glasperlen- als auch bei Alcoa-Aufschlüssen berechnet.

Je nach den sonstigen Versuchszielen wurde meist unterschiedlich hoch markiert. Daher sind die Werte häufig in Prozenten angegeben.

3.2.2.1. Degradation von Protein während der Inaktivierung in Minimalmedium

In Minimalmedium wurden die Zellen unterschiedlichen Markierungsprozeduren unterworfen:

a) Lange Pulse-Markierung - Chase-Inaktivierung:
Während der Derepression wurden die Zellen die gesamten 5 Stunden hindurch markiert (Pulse), um sämtliche während der Derepression synthetisierten Proteine zu markieren. Bei der folgenden Inaktivierungskultur (mit Glucose) bzw. Kontrollkultur (ohne Glucose) wurden dem frischen Minimalmedium als Chase 15 mM nicht markiertes Leucin zugesetzt.

b) Kurze Pulse-Markierung - Chase-Derepression/Chase-Inaktivierung:
Nach 1 Stunde der Derepression wurde mit der Markierung begonnen, 2 Stunden später wurde die Hefe wieder auf kaltes Minimalmedium umgesetzt, dem als Chase 15 mM Leucin zugesetzt war. Dadurch sollten nur die während der aktivsten Derepressionsphase synthetisierten und die kürzerlebigen Proteine markiert werden. Nach weiteren 2 Stunden, insgesamt also 5 Stunden Derepression wurde die Kultur geteilt: mit Glucose Inaktivierung, ohne Glucose Kontrolle.

c) Lange Pulse-Markierung - Chase-Derepression/Chase-Inaktivierung:
Die Zellen wurden 5 Stunden lang während der Derepression markiert. Nach Umsetzen auf frisches Minimalmedium mit 15 mM Leucin wurde die Kultur 4 Stunden lang weiter geschüttelt, ohne daß Glucose zugesetzt wurde. Die Zellen wurden wiederum umgesetzt auf frisches Minimalmedium mit 15 mM Leucin, die Kultur geteilt: mit Glucose Inaktivierung, ohne Glucose Kontrolle.
Mit dieser Versuchsführung sollte nach vollständiger Markierung der dereprimierten Proteine die Degradation unter Derepressionsbedingungen von der Degradation nach Glucosezugabe zeitlich getrennt werden.

Im einzelnen ergibt sich für die Gesamt-Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Zellen das folgende Bild:

Beim Vorgehen nach a) (lange Pulse-Markierung - Chase-Inaktivierung) nimmt der TCA-fällbare Anteil der Radioaktivität bei der Inaktivierung ab, bei der Kontrolle in etwas geringerem Maße (Abbildung 7). Mit Glucose findet also eine etwas stärkere Degradation statt als ohne.

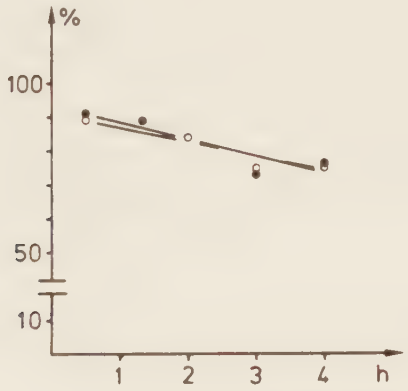

Abbildung 7: Gesamt-Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte bei langer Pulse-Markierung - Chase-Inaktivierung in Minimalmedium

Die Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte wurde nach 2.3.16.1. bestimmt. (●) Inaktivierung, (○) Kontrolle ohne Glucose.

Beim Vorgehen nach b) (kurze Pulse-Markierung - Chase-Derepression/Chase-Inaktivierung) nimmt der TCA-fällbare Anteil der Radioaktivität während der letzten Stunde der Derepression stark ab (Chase). Nach Glucosezugabe nimmt er zunächst weiter ab, allerdings weniger stark als bei der Derepression, um nach etwa 3 Stunden annähernd auf einem konstanten Wert zu bleiben. Die Kontrolle unterscheidet sich nur unwesent-

lich von der Inaktivierung (Abbildung 8). Eine bevorzugte Markierung der inaktivierbaren Proteine, wie zum Beispiel der c-MDH, hat also während der kurzen Pulse-Dauer nicht stattgefunden. Das Gegenteil ist der Fall: das radioaktive Leucin ist offensichtlich während der Markierungsphase stärker in die kurzlebigen, nicht inaktivierbaren Proteine eingebaut worden. Der Versuchsansatz: kurze Pulse-Markierung - Chase-Derepression/Chase-Inaktivierung wurde daher nicht weiter verfolgt.

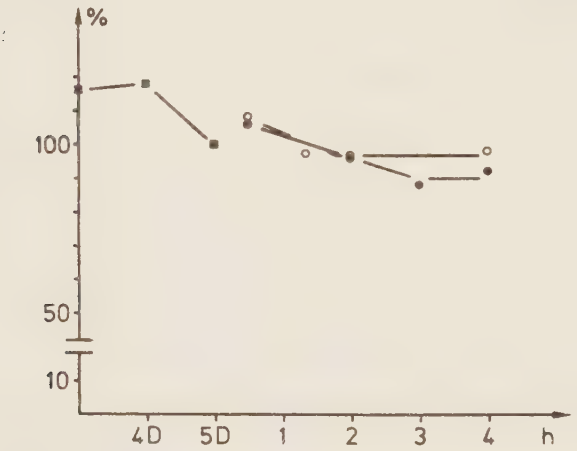

Abbildung 8: Gesamt-Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte bei kurzer Pulse-Markierung - Chase-Derepression/Chase-Inaktivierung in Minimalmedium

Die Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte wurde nach 2.3.16.1. bestimmt. (■) Chase-Derepression, (●) Inaktivierung, (○) Kontrolle ohne Glucose, D = Chase-Derepression.

Die Tatsache, daß in der ersten Stunde nach Beginn des Chase während der Derepression keine Abnahme des TCA-fällbaren Anteils zu beobachten ist, kann damit erklärt werden, daß die

Derepressions-Proteinsynthese noch in vollem Gange ist, daß also radioaktiv markiertes Leucin teilweise nicht mehr mit dem angebotenen kalten Leucin frei austauschbar ist. Gleichzeitig findet auch die Degradation von markierten Proteinen statt. Die beiden Prozesse können sich nach außen hin aufwiegen, so daß die Degradation nicht ersichtlich wird.

Am aufschlußreichsten für die Beantwortung der Frage, ob während der Inaktivierung eine stärkere Degradation von Proteinen auftritt als bei der Kontrolle, ist das Experiment mit der Vorgehensweise nach c) (lange Pulse-Markierung - Chase-Derepression/Chase-Inaktivierung), die ein "Entzerren" der beiden möglichen sich überlagernden Degradationsvorgänge unter Minimalbedingungen sowie unter Glucoseeinfluß erlauben sollte. Abbildung 9 zeigt, daß der TCA-fällbare Anteil beim Chase unter Minimalbedingungen zunächst stark, danach in geringerem Maße abnimmt. Bei der Inaktivierung nimmt er wei-

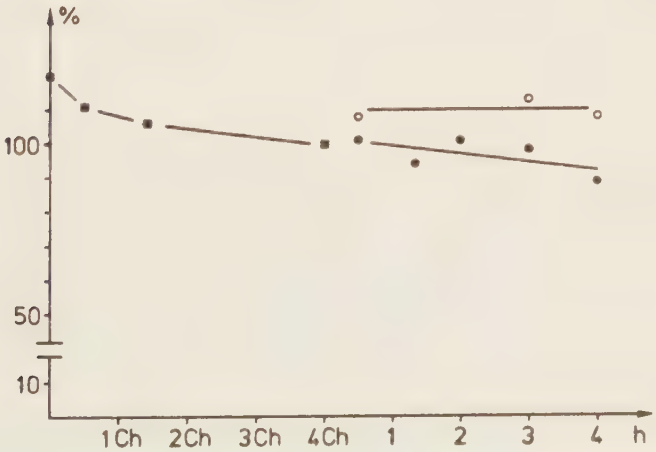

Abbildung 9: Gesamt-Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte bei langer Pulse-Markierung - Chase-Derepression/Chase-Inaktivierung im Minimalmedium

Die Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte wurde nach 2.3.16.1. bestimmt. (■) Chase-Derepression, (●) Inaktivierung, (○) Kontrolle ohne Glucose, Ch = Chase-Dere-

terhin ab, bei der Kontrolle dagegen überhaupt nicht mehr.

Damit ist gezeigt, daß durch Zugabe von Glucose zu einer Hefekultur, die unter Minimalbedingungen gehalten wurde, eine verstärkte Degradation des Proteins in Gang gesetzt wird.

Die geringen Versetzungen der Kurven in den Abbildungen rühren vom Umsetzen der Hefekulturen auf das jeweils neue Medium her.

Betrachtet man die spezifischen Radioaktivitäten der TCA-fällbaren Anteile (Abbildungen 10 bis 12), so ergibt sich in allen Fällen bei der Inaktivierung eine stärkere Abnahme als bei der Kontrolle.

Abbildung 10: Spezifische Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte bei langer Pulse-Markierung - Chase-Inaktivierung in Minimalmedium

Die Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte wurde nach 2.3.16.1., der Proteingehalt nach Lowry et al. (31) bestimmt. (●) Inaktivierung, (○) Kontrolle

Abbildung 11: Spezifische Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte bei kurzer Pulse-Markierung - Chase-Derepression/Chase-Inaktivierung in Minimalmedium

Die Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte wurde nach 2.3.16.1., der Proteingehalt nach Lowry et al. (31) bestimmt. (●) Inaktivierung, (○) Kontrolle

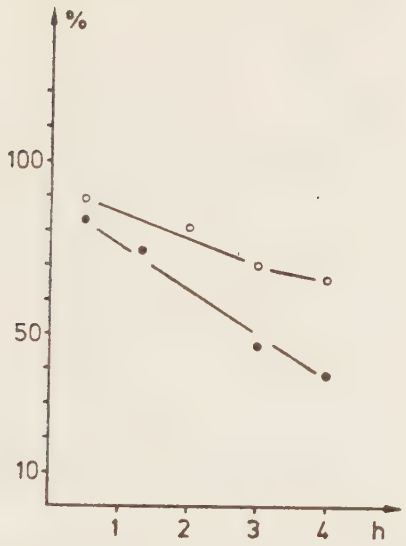

Abbildung 10

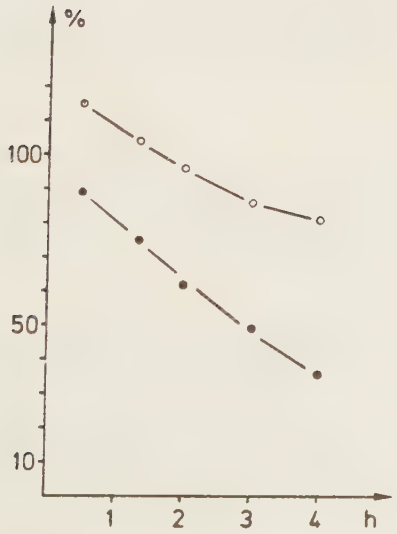

Abbildung 11

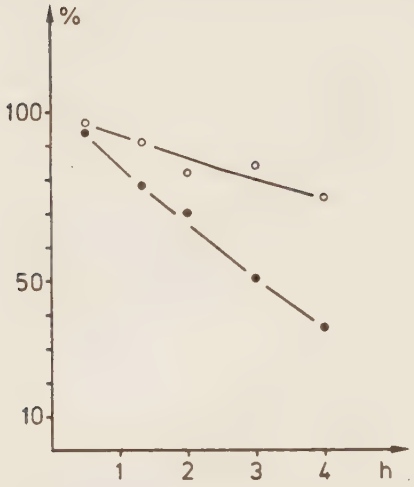

Abbildung 12: Spezifische Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte bei langer Pulse-Markierung - Chase-Derepression/Chase-Inaktivierung in Minimalmedium

Die Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte wurde nach 2.3.16.1., der Proteingehalt nach Lowry et al. (31) bestimmt. (●) Inaktivierung, (o) Kontrolle

Aus Pulse-Experimenten, bei denen die Rohextrakte mit Alcoa hergestellt wurden, ergeben sich die spezifischen Radioaktivitäten der TCA-fällbaren Anteile wie in Abbildung 13 dargestellt.

Der oben dargestellte Befund, daß unter Glucoseeinfluß eine stärkere Degradation stattfindet, wird durch sämtliche Auswertungen der spezifischen Radioaktivitäten bestätigt. Die Abnahme der spezifischen Radioaktivitäten ist durch die Zunahme der Proteinmenge allein nicht zu erklären, sondern nur durch Zunahme der Proteinmenge und Degradation von markiertem Protein zusammen.

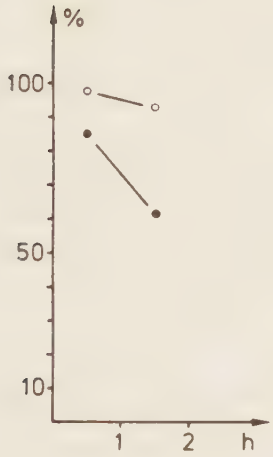

Abbildung 13: Spezifische Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte bei langer Pulse-Markierung in Minimalmedium und Aufschluß der Hefezellen mit Alcoa

Die Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte wurde nach 2.3.16.1., der Proteingehalt nach Lowry et al. (31) bestimmt. (●) Inaktivierung, (○) Kontrolle ohne Glucose.

3.2.2.2. Degradation von Protein während der Inaktivierung in Puffer ohne Zusatz von Nährsubstraten

Die Inaktivierung in Puffer wurde durchgeführt, um den Proteinturnover bei weitgehend verhindertem Zellwachstum mit dem Proteinturnover bei normalem Zellwachstum zu vergleichen.

Bei der Inaktivierung in Puffer wurde nach folgenden Prozeduren verfahren:

a) Lange Pulse-Markierung - Chase-Inaktivierung:
Die Zellen wurden während der gesamten 5 Stunden der Derepression markiert. Dem Inaktivierungs- bzw. Kontrollmedium wurde als Chase 15 mM Leucin zugesetzt.

b) Lange Pulse-Markierung:
Die Zellen wurden wie unter a) markiert.

Die Pulse-Markierung ohne Chase wurde durchgeführt, um eine Kontrolle darüber zu haben, ob die hohe Leucinkonzentration von 15 mM für den Chase einen Effekt auf die Proteindegradationsrate hat, wie dies bei Säugetiersystemen unter Mangelbedingungen beobachtet wurde (49,50,51). (Dieser Aspekt wird in Kapitel 3.2.3. diskutiert.)

Beim Verfahren nach a) (lange Pulse-Markierung - Chase-Inaktivierung) nimmt der TCA-fällbare Anteil bei der Inaktivierung zuerst stark, später in geringerem Maße ab, während er bei der Kontrolle anfangs schwächer, später gar nicht mehr abnimmt (Abbildung 14).

Die Entwicklung der Gesamt-Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Zellen bei der Vorgehensweise nach b) (lange Pulse-Markierung) ist aus Abbildung 15 zu ersehen. Der Versuch wurde nicht über die volle Zeit von 4 Stunden geführt, jedoch ist die Tendenz in dem Diagramm zu erkennen: Die Abnahme der Gesamt-Radioaktivität ist bei der Inaktivierung etwas steiler als bei der Kontrolle.

Abbildung 14: Gesamt-Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte bei langer Pulse-Markierung - Chase-Inaktivierung in Puffer

Die Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte wurde nach 2.3.16.1. bestimmt. (▲) Inaktivierung, (△) Kontrolle ohne Glucose

Abbildung 15: Gesamt-Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte bei langer Pulse-Markierung in Puffer

Die Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte wurde nach 2.3.16.1. bestimmt. (▲) Inaktivierung, (△) Kontrolle ohne Glucose

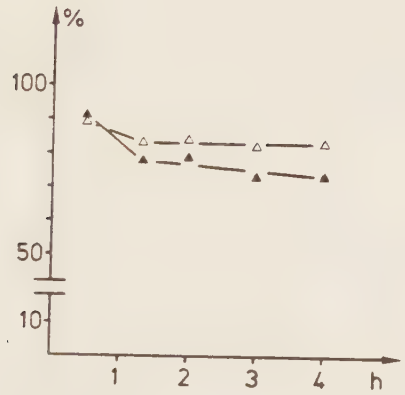

Abbildung 14

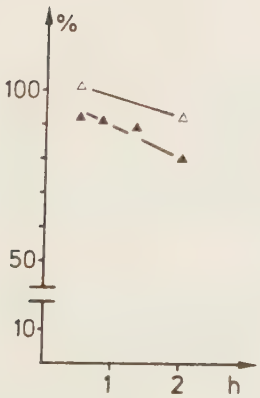

Abbildung 15

Aus der Darstellung der spezifischen Radioaktivitäten der TCA-fällbaren Anteile (Abbildungen 16 und 17) ist jeweils eine deutliche Abnahme bei der Inaktivierung zu erkennen, bei der Kontrolle findet man keine Abnahme.

Die Abnahme der spezifischen Radioaktivitäten unter Glucoseeinfluß ist auch hier (wie bei den Untersuchungen in Minimalmedium) nicht allein durch die Zunahme der Proteinmenge zu erklären, sondern auch durch die Degradation von markiertem Protein.

Zur Kontrolle der erhaltenen Befunde wurde die proteingebundene Radioaktivität der Zellen nach der Methode von Mans und Novelli (45) bestimmt (s. Kapitel 2.3.16.2.). Diese Methode unterscheidet sich von der in dieser Arbeit routinemäßig angewandten Methode durch die größere Anzahl der Waschvorgänge und Extraktionen. Nucleinsäuren, TCA und Lipide werden gründlicher entfernt, und die Radioaktivität wird anders ausgezählt.

Es wurde festgestellt, daß bei Markierung der Proteine während der Derepression vernachlässigbar wenig Radioaktivität (<2 %) in Nucleinsäuren und Lipide eingebaut wird.

Abbildung 16: Spezifische Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte bei langer Pulse-Markierung - Chase-Inaktivierung in Puffer

Die Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte wurde nach 2.3.16.1., der Proteingehalt nach Lowry et al. (31) bestimmt. (▲) Inaktivierung, (△) Kontrolle

Abbildung 17: Spezifische Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte bei langer Pulse-Markierung in Puffer

Die Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte wurde nach 2.3.16.1., der Proteingehalt nach Lowry et al. (31) bestimmt. (▲) Inaktivierung, (△) Kontrolle

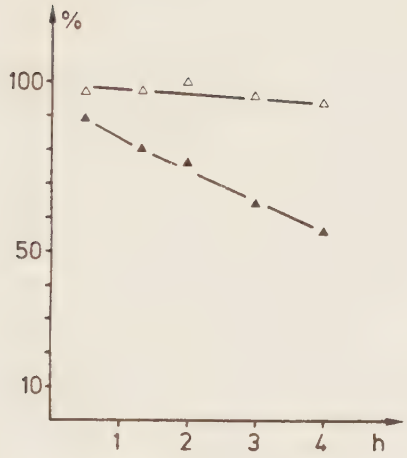

Abbildung 16

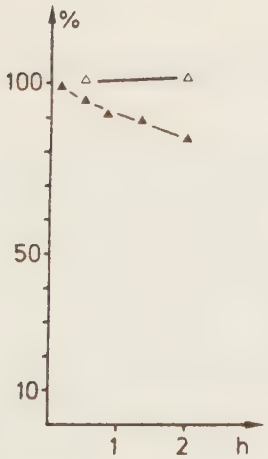

Abbildung 17

Die gemessenen Werte für den TCA-fällbaren Anteil stimmten bei den beiden Methoden beinahe überein (Tabelle 3): die Bestimmungen nach Mans und Novelli lagen um 2 bis 8 Prozent unter denen nach der Routinemethode.

Tabelle 3: Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität. Vergleich der in der vorliegenden Arbeit routinemäßig angewandten mit der Methode nach Mans und Novelli (45)

Die Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität ist in den Kapiteln 2.3.16.1. und 2.3.16.2. beschrieben. Werte in cpm.

	Radioaktivität im TCA-fällbaren Anteil pro ml Rohextrakt	
Probe	Routinemethode	Mans/Novelli
5 h Derepression	5 353 000	4 939 000
2 h Inaktivierung	3 538 000	3 456 000

3.2.3. Berechnung von Proteindegradationsraten

Im Hinblick auf die Aufklärung des Mechanismus der glucoseabhängigen Enzyminaktivierung ist die Kenntnis der Degradationsrate von Protein in den ersten beiden Stunden nach Zugabe von Glucose von besonderem Interesse, da die Inaktivierung der glucose-sensitiven Enzyme im wesentlichen innerhalb dieses Zeitraums abläuft.

Aus den Abbildungen 7 und 9 (Kapitel 3.2.2.1.) sowie 14 und 15 (Kapitel 3.2.2.2.) können die Gesamt-Radioaktivitäten der TCA-fällbaren Anteile relativ zum Derepressions-Endwert entnommen werden (Tabelle 4, 1. Spalte). Um die Degradationsraten berechnen und alle Werte miteinander vergleichbar machen

zu können, werden nun alle Gesamt-Radioaktivitäten auf die zugehörigen Anfangsgrößen bezogen (das sind die ersten Meßwerte 0,5 Stunden nach dem Beginn der Inaktivierungs- bzw. Kontrollkultur; Tabelle 4, 2. Spalte).

Zur Vereinfachung der Berechnung wird angenommen, daß die Degradation in den betrachteten ersten beiden Stunden linear verlaufe (in Wirklichkeit verläuft die Degradation eines Gemischs von Proteinen verschiedener Halbwertzeiten immer nach einer Exponentialfunktion). Damit läßt sich aus den Anfangswerten (0,5 Stunden) und den Endwerten (2 Stunden) die Degradationsrate des gesamten löslichen Proteins der Zelle als Näherungswert berechnen (letzte Spalte in Tabelle 4).

In allen Fällen ergibt sich, daß die Gesamt-Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils unter dem Einfluß von Glucose schneller abnimmt als bei den Kontrollkulturen.

Vergleich der beiden Versuchsführungen in Minimalmedium (Tabelle 4A):

Die Degradationsrate von -5,3 Prozent pro Stunde (pph) bei Versuch a) (lange Pulse-Markierung - Chase-Inaktivierung) setzt sich zusammen aus der Degradation der glucose-sensitiven Proteine und der Degradation von glucose-insensitiven Proteinen.

Nach dem "Entzerren" der Degradation der verschiedenen Proteine bei Versuch b) (lange Pulse-Markierung - Chase-Derepression/Chase-Inaktivierung) ergibt sich die Degradationsrate der glucose-sensitiven Proteine zu -2,7 pph. Glucose-insensitive Proteine werden während der Inaktivierungsphase nicht mehr abgebaut (Kontrolle: 0 pph). Die Degradation der glucose-insensitiven Proteine hat schon während der vorgeschalteten Chase-Derepressions-Phase stattgefunden.

Tabelle 4A: Proteindegradationsraten bei der Inaktivierung in Minimalmedium

	Gesamt-Radioaktivität TCA-fällbarer Anteil		Degradationsrate	
	relativ zum Derepressions-Endwert	relativ zum 0,5-Stunden-Wert	(Prozent pro 1,5 Stunden)	(Prozent pro Stunde)
a) Lange Pulse-Markierung - Chase-Inaktivierung				
0,5 h Inaktivierung	91 %	100 %		
2 h Inaktivierung	84 %	92 %	-8	-5,3
0,5 h Kontrolle	89 %	100 %		
2 h Kontrolle	84 %	94 %	-6	-4,0
b) Lange Pulse-Markierung - Chase-Derepression/ Chase-Inaktivierung				
0,5 h Inaktivierung	101 %	100 %		
2 h Inaktivierung	97 %	96 %	-4	-2,7
0,5 h Kontrolle	110 %	100 %		
2 h Kontrolle	110 %	100 %	0	0

Tabelle 4B: Proteindegradationsraten bei der Inaktivierung in Puffer

	Gesamt-Radioaktivität TCA-fällbarer Anteil		Degradationsrate	
	relativ zum Derepressions-Endwert	relativ zum 0,5-Stunden-Wert	(Prozent pro 1,5 Stunden)	(Prozent pro Stunde)
a) Lange Pulse-Markierung - Chase-Inaktivierung				
0,5 h Inaktivierung	91 %	100 %		
2 h Inaktivierung	77 %	85 %	-15	-10,0
0,5 h Kontrolle	89 %	100 %		
2 h Kontrolle	83 %	93 %	-7	-4,7
b) Lange Pulse-Markierung				
0,5 h Inaktivierung	92 %	100 %		
2 h Inaktivierung	80 %	87 %	-13	-8,7
0,5 h Kontrolle	101 %	100 %		
2 h Kontrolle	92 %	91 %	-9	-6,0

Vergleich der beiden Versuchsführungen in Puffer (Tabelle 4B):

Eine Verringerung der Degradationsrate durch den Einsatz hoher Leucinkonzentrationen für den Chase wird nicht beobachtet. Ohne Chase ergibt sich eine geringere Degradationsrate, was mit dem Wiedereinbau von markiertem Leucin in neusynthetisierte Proteine zu erklären ist. Mit Chase wird dieser Wiedereinbau verhindert.

Vergleich der beiden Experimente a) (lange Pulse-Markierung - Chase-Inaktivierung) in Minimalmedium und in Puffer:

Die Degradationsrate in Puffer (-10 pph) ist deutlich höher als die in Minimalmedium (-5,3 pph). Diese Differenz dürfte Ausdruck des unterschiedlichen Angebots an Nährstoffen für die Hefe sein:

In Minimalmedium steht als Kohlenstoffquelle Glucose (und Acetat) und als Stickstoffquelle Yeast Nitrogen Base zur Verfügung, so daß sämtliche Synthese- und Stoffwechselleistungen möglich sind.

In Puffer steht als Kohlenstoffquelle Glucose zur Verfügung, eine exogene Stickstoffquelle ist jedoch nicht vorhanden. Um dennoch über eine nennenswerte Menge an Präcursoren für die Proteinsynthese verfügen zu können, werden verstärkt Proteine degradiert, die unter den gegebenen Bedingungen für den Organismus nicht essentiell sind.

Diese Deutung steht in Einklang damit, daß bei Inkubation von Hefe unter Mangelbedingungen erhöhte proteolytische Aktivitäten auftreten (52,53,54,55,56).

Aus Abbildung 9 (Kapitel 3.2.2.1.) lassen sich neben den Daten für die Degradation der glucose-sensitiven Proteine (Chase-Inaktivierungs-Phase) auch die Daten für die Degradation der glucose-insensitiven Proteine mit kurzer Lebensdauer entnehmen (Chase-Derepressions-Phase).

Die Gesamt-Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils folgt während dieser Phase einer Exponentialfunktion. Praktisch das gesamte Inventar der Zelle an diesen kurzlebigen glucose-insensitiven Proteinen wird während 4 Stunden abgebaut, davon 42,5 % während der ersten halben Stunde. Daraus errechnet sich eine durchschnittliche Halbwertzeit der kurzlebigen glucose-insensitiven Proteine von ca. 36 Minuten.

3.2.4. Zunahme des niedermolekularen Anteils während der Inaktivierung

Werden radioaktiv markierte Proteine proteolytisch abgebaut, so muß eine entsprechende Menge Radioaktivität in der niedermolekularen Fraktion der Zelle auftauchen. Bei den untersuchten Hefekulturen wurde beobachtet, daß eine erhebliche Menge Radioaktivität in das Kulturmedium abgegeben wurde. Da die Radioaktivität im Medium fast ausschließlich in Form niedermolekularer Substanzen auftrat, wurde die Radioaktivität des TCA-löslichen Anteils der Rohextrakte und die Radioaktivität im Medium zusammengefaßt (die nähere Untersuchung der Kulturmedien wird in Kapitel 3.2.8. beschrieben).

In den Abbildungen 18 bis 20 werden die Entwicklungen der niedermolekularen Fraktionen unter den unterschiedlichen Inaktivierungsbedingungen in Minimalmedium, in den Abbildungen 21 und 22 für die Inaktivierung in Puffer dargestellt. In allen untersuchten Fällen nehmen die niedermolekularen Anteile unter Einfluß von Glucose stärker zu als ohne Glucose.

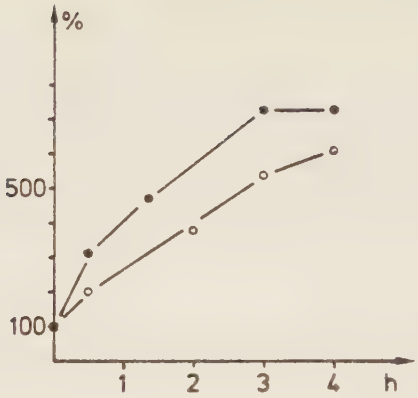

Abbildung 18: Gesamt-Radioaktivität der niedermolekularen Anteile bei langer Pulse-Markierung - Chase-Inaktivierung in Minimalmedium

Die Gesamt-Radioaktivität der niedermolekularen Anteile ist die Summe aus Gesamt-Radioaktivität der TCA-löslichen Anteile der Rohextrakte und Gesamt-Radioaktivität im Kulturmedium. (●) Inaktivierung, (O) Kontrolle ohne Glucose

---

Abbildung 19: Gesamt-Radioaktivität der niedermolekularen Anteile bei kurzer Pulse-Markierung- Chase-Derepression/Chase-Inaktivierung in Minimalmedium

Die Gesamt-Radioaktivität der niedermolekularen Anteile ist die Summe aus Gesamt-Radioaktivität der TCA-löslichen Anteile der Rohextrakte und Gesamt-Radioaktivität im Kulturmedium. (●) Inaktivierung, (O) Kontrolle ohne Glucose

Abbildung 20: Gesamt-Radioaktivität der niedermolekularen Anteile bei langer Pulse-Markierung - Chase-Derepression/Chase-Inaktivierung in Minimalmedium

Die Gesamt-Radioaktivität der niedermolekularen Anteile ist die Summe aus Gesamt-Radioaktivität der TCA-löslichen Anteile der Rohextrakte und Gesamt-Radioaktivität im Kulturmedium. (●) Inaktivierung, (O) Kontrolle ohne Glucose

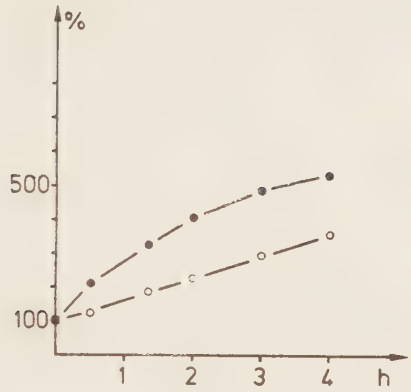

Abbildung 19

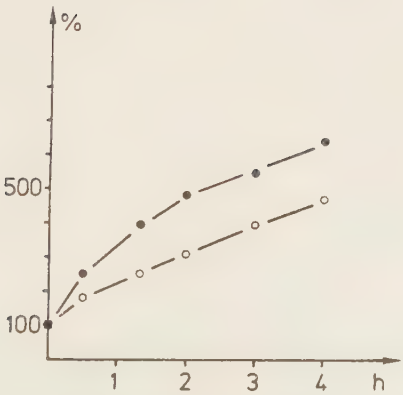

Abbildung 20

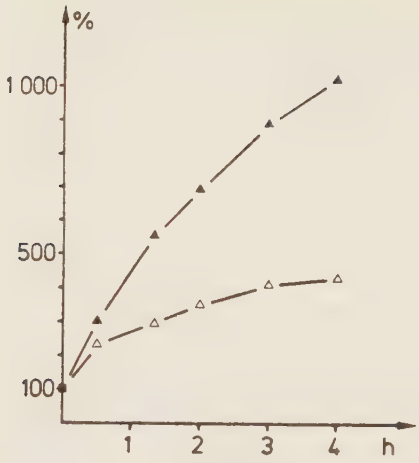

Abbildung 21: Gesamt-Radioaktivität der niedermolekularen Anteile bei langer Pulse-Markierung - Chase-Inaktivierung in Puffer

Die Gesamt-Radioaktivität der niedermolekularen Anteile ist die Summe aus Gesamt-Radioaktivität der TCA-löslichen Anteile der Rohextrakte und Gesamt-Radioaktivität im Kulturmedium. (▲) Inaktivierung, (△) Kontrolle ohne Glucose

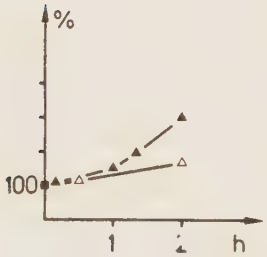

Abbildung 22: Gesamt-Radioaktivität der niedermolekularen Anteile bei langer Pulse-Markierung in Puffer

Die Gesamt-Radioaktivität der niedermolekularen Anteile ist die Summe aus Gesamt-Radioaktivität der TCA-löslichen Anteile der Rohextrakte und Gesamt-Radioaktivität im Kulturmedium. (▲) Inaktivierung, (△) Kontrolle ohne Glucose

3.2.5. Quantitativer Vergleich der Abnahme von markiertem Protein und der Zunahme des niedermolekularen Anteils

In diesem Kapitel wird die Abnahme der Radioaktivität der TCA-fällbaren Anteile der Zunahme der Radioaktivität der niedermolekularen Anteile der Rohextrakte gegenübergestellt. Aus Tabelle 5 sind die absoluten Zu- bzw. Abnahmen der verschiedenen Fraktionen zu ersehen. Der Übersicht halber sind nur die Anfangs- und Endwerte der jeweiligen Kulturen aufgeführt.

Die Zusammenstellung zeigt, daß die Abnahme des markierten Proteins in etwa der Zunahme des niedermolekularen Anteils entspricht. Eine Erklärung für auftretende Differenzen könnte in den wechselnden Anteilen der Radioaktivität in Zellwand und membran-gebundenen Molekülen zu finden sein. Eine quantitative Bestimmung dieser Anteile ist weder aus Glasperlen- noch aus Alcoa-Aufschlüssen ohne weiteres möglich, da dabei Zelltrümmer, Membranen, Reste des Extraktes und Glasperlen bzw. Aluminiumoxid mit unbestimmbaren anteiligen Volumina als Pellet zurückbleiben. Kohlendioxid geht unter den gewählten Kulturbedingungen zwar meßbar in das Kulturmedium, jedoch nur in verschwindend geringen Mengen in den Luftraum (s. Kapitel 3.2.8.).

Tabelle 5A: Proteingebundene Radioaktivität und Radioaktivität des niedermolekularen Anteils bei der Inaktivierung in Minimalmedium (Angaben in 10^6 cpm)

a) Lange Pulse-Markierung - Chase-Inaktivierung

	TCA-fällbarer Anteil	Differenz	niedermol. Anteil	Differenz
0,5 h Inaktivierung	16,3		6,5	
4 h Inaktivierung	13,8	-2,5	9,5	+3,0
0,5 h Kontrolle	16,1		5,7	
4 h Kontrolle	13,6	-2,5	8,6	+2,9

b) Kurze Pulse-Markierung - Chase-Derepression/Chase-Inaktiv.

	TCA-fällbarer Anteil	Differenz	niedermol. Anteil	Differenz
0,5 h Inaktivierung	12,2		22,0	
4 h Inaktivierung	10,6	-1,6	24,0	+2,0
0,5 h Kontrolle	12,4		21,4	
4 h Kontrolle	11,3	-1,1	22,9	+1,5

c) Lange Pulse-Markierung - Chase-Derepression/Chase-Inaktiv.

	TCA-fällbarer Anteil	Differenz	niedermol. Anteil	Differenz
0,5 h Inaktivierung	12,8		13,6	
4 h Inaktivierung	11,0	-1,8	14,9	+1,3
0,5 h Kontrolle	13,5		13,3	
4 h Kontrolle	13,6	+0,1	14,6	+1,3

Tabelle 5B: Proteingebundene Radioaktivität und Radioaktivität des niedermolekularen Anteils bei der Inaktivierung in Puffer (Angaben in 10^6 cpm)

a) Lange Pulse-Markierung - Chase-Inaktivierung

	TCA-fällbarer Anteil	Differenz	niedermol. Anteil	Differenz
0,5 h Inaktivierung	20,7		5,2	
4 h Inaktivierung	16,6	-4,1	9,3	+4,1
0,5 h Kontrolle	20,2		4,8	
4 h Kontrolle	18,8	-1,4	5,9	+1,1

b) Lange Pulse-Markierung

	TCA-fällbarer Anteil	Differenz	niedermol. Anteil	Differenz
0,5 h Inaktivierung	18,8		2,4	
2 h Inaktivierung	16,2	-2,6	4,2	+1,8
0,5 h Kontrolle	20,5		2,4	
2 h Kontrolle	18,6	-1,9	2,8	+0,4

3.2.6. Spezifität der Degradation von Proteinen während der Inaktivierung

In Kapitel 3.2.2. wird beschrieben, wie bei der Inaktivierung die Degradation von Proteinen nachgewiesen wurde, die während der Derepressionsphase synthetisiert worden waren. Weitere Experimente sollten darüber Aufschluß geben, ob unter Glucoseeinfluß die während der Derepressionsphase synthetisierten Proteine selektiv abgebaut werden oder ob noch andere in der Zelle vorhandene Proteine von dieser Degradation betroffen sind. Dazu wurden die Proteine während der letzten 4 Stunden der Anzucht mit Tritium markiert (^{3}H-Leucin), während der Derepression wie üblich mit ^{14}C (^{14}C-Leucin).

Während der Inaktivierung sinkt die spezifische Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils (Alcoa-Aufschluß) bei ^{3}H auf 88 %, bei ^{14}C auf 85 % der Anfangswerte (Tabelle 6). Ebenso werden beide Isotope in das Kulturmedium abgegeben (Tabelle 7).

Tabelle 6: Spezifische Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte bei Inaktivierung doppelmarkierter Zellen in Puffer (Angaben in cpm/mg)

	Spezifische Radioaktivität	
	^{3}H	^{14}C
0,5 h Inaktivierung	402 000	323 000
3 h Inaktivierung	355 000	276 000

Tabelle 7: Abgabe von ^{3}H- und ^{14}C-markierten Stoffen an das Kulturmedium während der Inaktivierung doppelmarkierter Zellen in Puffer (Angaben in cpm)

	Gesamt-Radioaktivität	
	^{3}H	^{14}C
3 h Inaktivierung	12 375 000	13 820 000

Damit ist gezeigt, daß die glucoseabhängige Degradation von Proteinen nicht spezifisch die dereprimierbaren Proteine betrifft, sondern daß durch eine generelle Stoffwechselumstellung von Acetat auf Glucose ein verstärkter Abbau von Proteinen ausgelöst wird. Es ist möglich, daß dabei einige dereprimierbare Proteine besonders stark betroffen werden, wenn sie sehr sensitiv gegenüber proteolytischer Aktivität sind, wie dies zum Beispiel für die c-MDH und die FBPase in Hefe angegeben wird (23,24,22,25).

Der Nachweis der Degradation von Proteinen nach Zugabe von Glucose zu einer in Minimalmedium gehaltenen Kultur wurde über die Abnahme der Gesamtradioaktivität des TCA-fällbaren und über die Zunahme der Gesamtradioaktivität des niedermolekularen Materials geführt (s. Kapitel 3.2.2. bis 3.2.5.).

Wie weit die Degradation geführt wird, bis zu Peptiden mit einem Molekulargewicht irgendwo unter 10 000 D oder bis zu Oligopeptiden und freien Aminosäuren, geht aus diesen Experimenten nicht hervor.

Sollten tatsächlich während der Inaktivierung vorher nicht vorhandene Oligopeptide und freie Aminosäuren auftreten, wäre das ein weiterer direkter Nachweis für die Degradation von Proteinen unter diesen Kulturbedingungen.

Diese Frage kann entweder durch Untersuchung des TCA-lösli-

chen Anteils der Zellen oder unter Umständen durch Charakterisierung der ins Inaktivierungsmedium abgegebenen Stoffe geklärt werden. Die Charakterisierung der letzteren ist methodisch einfacher, da das Inaktivierungsmedium nach Abzentrifugieren der Hefezellen direkt in die Untersuchung eingesetzt werden kann, wogegen im ersten Fall Zellaufschluß und Säurefällung nötig sind, eventuell auch noch die Neutralisierung der Säure. Aus diesen Gründen wurde zunächst die Charakterisierung der ins Inaktivierungsmedium abgegebenen Stoffe angegangen (Kapitel 3.2.7. und 3.2.8.).

3.2.7. Abgabe von Radioaktivität in das Kulturmedium

Betrachtet man die Abgabe von Radioaktivität ins Medium für sich allein (Abbildungen 23 bis 27), so fällt auf, daß bei der Inaktivierung in Puffer die abgegebene Menge größer ist als bei der Inaktivierung in Minimalmedium. Bei der Kontrolle in Minimalmedium wird zwar weniger Radioaktivität abgegeben als bei der zugehörigen Inaktivierung, jedoch ist die Menge hierbei immer noch erheblich. Dagegen ist die Abgabe bei der Kontrolle in Puffer fast vernachlässigbar klein. Dieser letzte Befund findet eine Erklärung wohl darin, daß die Hefe unter solchen absoluten Mangelbedingungen (keine exogene Kohlenstoffquelle, keine exogene Stickstoffquelle) sämtliche Stoffwechselaktivitäten auf ein Minimum verringert oder sogar einstellt.

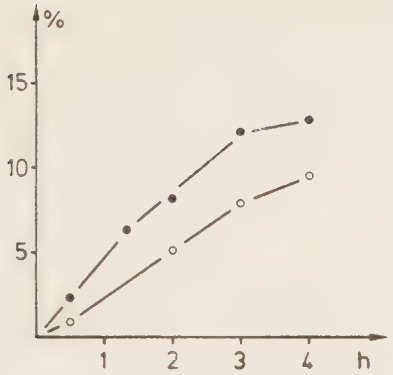

Abbildung 23: Abgabe von radioaktiven Stoffen in das Kulturmedium bei langer Pulse-Markierung - Chase-Inaktivierung in Minimalmedium

Gesamt-Radioaktivität im Kulturmedium in Prozent der vor Zugabe von Glucose in den Zellen befindlichen Gesamt-Radioaktivität. (●) Inaktivierung, (o) Kontrolle ohne Glucose

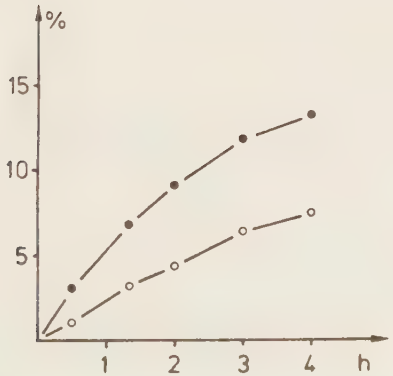

Abbildung 24: Abgabe von radioaktiven Stoffen in das Kulturmedium bei kurzer Pulse-Markierung - Chase-Derepression/Chase-Inaktivierung in Minimalmedium

Gesamt-Radioaktivität im Kulturmedium in Prozent der vor Zugabe von Glucose in den Zellen befindlichen Gesamt-Radioaktivität. (●) Inaktivierung, (o) Kontrolle ohne Glucose

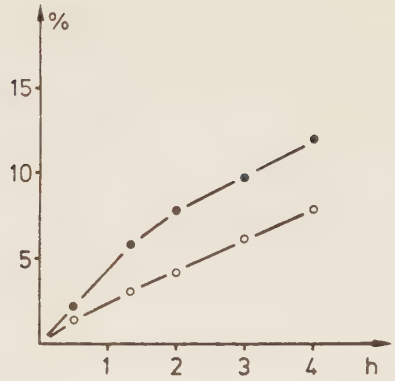

Abbildung 25: Abgabe von radioaktiven Stoffen in das Kulturmedium bei langer Pulse-Markierung - Chase-Derepression/Chase-Inaktivierung in Minimalmedium

Gesamt-Radioaktivität im Kulturmedium in Prozent der vor Zugabe von Glucose in den Zellen befindlichen Gesamt-Radioaktivität. (●) Inaktivierung, (○) Kontrolle ohne Glucose

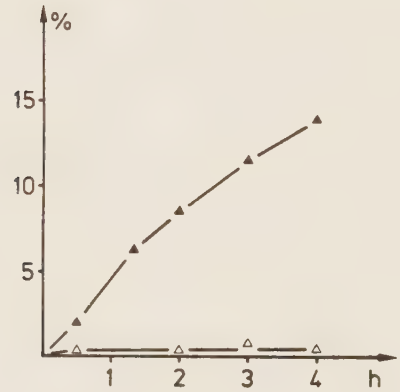

Abbildung 26: Abgabe von radioaktiven Stoffen in das Kulturmedium bei langer Pulse-Markierung - Chase-Inaktivierung in Puffer

Gesamt-Radioaktivität im Kulturmedium in Prozent der vor Zugabe von Glucose in den Zellen befindlichen Gesamt-Radioaktivität. (▲) Inaktivierung, (△) Kontrolle ohne Glucose

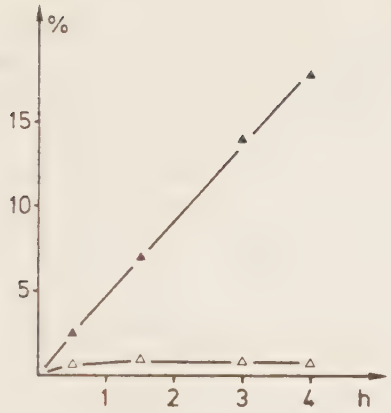

Abbildung 27: Abgabe von radioaktiven Stoffen in das Kulturmedium bei langer Pulse-Markierung in Puffer

Gesamt-Radioaktivität im Kulturmedium in Prozent der vor Zugabe von Glucose in den Zellen befindlichen Gesamt-Radioaktivität. (▲) Inaktivierung, (△) Kontrolle ohne Glucose

3.2.8. Charakterisierung der in das Inaktivierungsmedium abgegebenen radioaktiven Stoffe

Für die Analyse wurde das Medium der Inaktivierung in Puffer gewählt, da hierbei die für die Untersuchung zur Verfügung stehende Menge an radioaktivem Material größer ist als bei der Inaktivierung in Minimalmedium.

3.2.8.1. Fällbarkeit von Bestandteilen des Inaktivierungsmediums mit TCA

Die erste Untersuchung des Inaktivierungsmediums galt der Frage, ob sich unter den radioaktiven Stoffen Proteine befinden. Dazu wurde eine TCA-Fällung versucht. Mit dem Auge ist eine Fällung von Protein durch TCA-Zugabe nicht feststellbar, auch dann nicht, wenn das Inaktivierungsmedium vor der Zugabe von TCA stark eingeengt wurde.

Führt man eine Proteinbestimmung nach Lowry (31) durch, so werden nicht nur Proteine, sondern auch kleinere Moleküle mit Aminogruppen, z.B. Peptide, mit erfaßt. Nach Zugabe von TCA bis zu einer Konzentration von 10 % (w/v), halbstündigem Äquilibrierenlassen und Abzentrifugieren findet man von dem im Inaktivierungsmedium nach Lowry bestimmten Wert 97 % weiterhin im Überstand, 3 % im Niederschlag. Bei Auszählen der Radioaktivität findet man 95 bis 96 % im Überstand, den Rest im Niederschlag. 3 bis 5 % des nach Lowry bestimmten Wertes bzw. der Radioaktivität sind also an Moleküle mit einem Molekulargewicht größer als ca. 10 000 Daltons gebunden, alles andere sind kleinere Moleküle.

3.2.8.2. Ultrafiltration des Inaktivierungsmediums

Zur weiteren Eingrenzung der Molekulargewichte wurde das Inaktivierungsmedium mit einer Ultrafiltrationszelle eingeengt. Die verwendete Membran hatte eine Ausschlußgrenze von 1000 Daltons. Aus den erhaltenen Daten (Tabelle 8) ergibt sich, daß ca. 7 % der gesamten Radioaktivität an Moleküle mit einem Molekulargewicht größer als 1000 Daltons gebunden sind, die restlichen 93 % an solche mit einem Molekulargewicht kleiner als 1000 Daltons.

Durch Zugabe einer größeren Menge radioaktiv markierten Leucins zum Inaktivierungsmedium, anschließende Ultrafiltration

Tabelle 8: Ultrafiltration des Inaktivierungsmediums. Bestimmung der Anteile an Molekülen mit Molekulargewichten kleiner bzw. größer als 1000 Daltons

	Volumen (ml)	Volumen-Aktivität (cpm/ml)	Gesamt-Aktivität (cpm)	Anteil <1000 D (cpm)	Anteil >1000 D (cpm)
Nach der Ultrafiltration im Durchlauf	425	212	90 100	90 100	0
Nach der Ultrafiltration in der Zelle	33	442 → 212 < 1000 D; 442 → 230 > 1000 D	14 586	6 996	7 590
Vor der Ultrafiltration im Medium	458	229	104 882	97 096 +)	7 590 +

Im Durchlauf befinden sich ausschließlich Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner als 1000 Daltons. Im Konzentrat in der Ultrafiltrationszelle befinden sich dieselben niedermolekularen Stoffe mit derselben Volumen-Aktivität wie im Durchlauf. Die Differenz zwischen Volumenaktivität in der Zelle und Volumen-Aktivität im Durchlauf ergibt die Volumen-Aktivität der höhermolekularen Stoffe in der Zelle.

+) Die Summe der gemessenen Anteile mit Molekulargewichten kleiner bzw. größer als 1000 Daltons beträgt 104 686 cpm. Die Differenz zur gemessenen Gesamt-Aktivität vor Durchführung der Ultrafiltration beträgt 196 cpm (ca. 0,2 %) und liegt innerhalb des Meßfehlers beim Auszählen der Radioaktivität.

und Probennahme/Auszählen zu verschiedenen Zeitpunkten dieser Prozedur wurde nachgewiesen, daß freies Leucin unter den gewählten Bedingungen bei jedem Grad der Einengung die Membran ungehindert passiert und somit nicht verantwortlich für die Ansammlung von Radioaktivität in der Ultrafiltrationszelle ist.

3.2.8.3. Ionenaustauschchromatographie

Basische und neutrale Aminosäuren werden bei niedrigen pH-Werten von einem stark sauren Kationenaustauscher (hier Dowex 50 WX 4) gebunden, saure Aminosäuren, neutrale und negativ geladene Moleküle nicht. Damit ist es möglich, freies Leucin (und andere neutrale oder basische Aminosäuren) von Glucose und anderen Bestandteilen des Inaktivierungsmediums zu trennen. Die Abtrennung von Glucose ist für die Ausführung der Papierelektrophorese wichtig (s. Kapitel 3.2.8.5.).

Zur Durchführung der Ionenaustauschchromatographie s. Kapitel 2.3.9.1.

Vom Inaktivierungsmedium werden 99 % der Radioaktivität nicht gebunden, die durchgelaufenen Bestandteile ergeben mit Ninhydrin keine Farbreaktion. 1 % der Radioaktivität läßt sich nach Waschen der Säule eluieren, die Ninhydrinprobe verläuft positiv. Bei 1 % der Radioaktivität im Inaktivierungsmedium handelt es sich also um freies Leucin oder um leucinhaltige Peptide, während fast die gesamte ins Medium abgegebene Radioaktivität in Form von Stoffwechselprodukten des Leucins erscheint.

3.2.8.4. Flüchtige Bestandteile des Inaktivierungsmediums

Die Bestimmung von radioaktivem Kohlendioxid läßt sich einfach durchführen. Der Schüttelkolben mit der Kultur wird mit einem Gummistopfen gasdicht verschlossen, an dem ein mit Hyamine-Lösung getränkter Filterpapierdocht so befestigt wird, daß er vor Spritzern der Zellsuspension geschützt ist. Zum gewünschten Zeitpunkt wird mittels einer Spritze durch den Stopfen so viel TCA-Lösung zugegeben, daß die Kultursuspension 10-prozentig an TCA wird. Dadurch wird die Kultur abgestoppt und das CO_2 aus der Suspension vollständig ausgetrieben. Nach weiterem gründlichem Schütteln wird der

Hyamine-Docht herausgenommen und im LSC ausgezählt.

Im vorliegenden Fall sind zwei Stunden nach Glucosezugabe 25 % der Radioaktivität im Kulturmedium an CO_2 gebunden.

Ohne Zugabe von Säure werden nur ganz geringfügige Mengen Radioaktivität am Hyamine-Docht gefunden. Ein Übertritt von Radioaktivität aus dem Medium in die Luft und damit eine Abnahme der Radioaktivität im Medium findet selbst nach längerem Stehenlassen nicht statt. Einfrieren und Wiederauftauen des Mediums nach Stunden oder nach Monaten führt (auch bei Wiederholung) ebenfalls zu keinerlei Abnahme der Radioaktivität im Medium.

Bei den im folgenden beschriebenen Versuchen müssen die Zahlenangaben über die flüchtigen Anteile des Inaktivierungsmediums als Näherungswerte verstanden werden. Beim Einengen von Inaktivierungsmedium durch Lyophilisieren wird eine erhebliche Verringerung der Zählausbeute (Quench) der nichtflüchtigen Radioaktivität durch Glucose und Salze beobachtet. Experimentell wurde ein Quenchfaktor von etwa 2,5 bestimmt. Dasselbe gilt für die Auftragung von Inaktivierungsmedium auf Filterpapier und anschließendes Eintrocknen der Lösung mittels Stehenlassen an der Luft, Föhn oder Ölvakuum. Der Quench ist bei den im folgenden gemachten Angaben berücksichtigt. Bezugsgröße ist in allen Fällen der Wert, der gemessen wird, wenn ein entsprechendes Aliquot des Inaktivierungsmediums direkt im LSC ausgezählt wird. Ein Quench durch das verwendete Filterpapier tritt nicht auf.

Zur Papierelektrophorese werden die Proben des Inaktivierungsmediums auf einer möglichst kleinen Fläche des Elektrophorese-Papiers aufgetragen und vor der Durchführung der Elektrophorese getrocknet. Je nach Art der Trocknung bleiben unterschiedliche Mengen an Radioaktivität auf dem Papier zurück:
bei Trocknung durch Stehenlassen an der Luft ca. 30 %,
bei Trocknung mit einem kalten Luftstrom (Föhn) ca. 20 %,
bei Trocknung in einer Kammer mittels Ölvakuum ca. 4 % - 70 %, 80 %, 96 % der gesamten Radioaktivität sind unter den

jeweiligen Bedingungen flüchtig.

Lyophilisiert man Inaktivierungsmedium und löst den Rückstand in einer geringen Menge Wasser wieder auf, so findet man lediglich 20 - 30 % der Radioaktivität wieder, die fehlenden 70 - 80 % sind flüchtige Stoffe.

Bei Auftragung der nach der Gefriertrocknung erhaltenen Lösung zur Papier-Elektrophorese und Trocknung mit einem kalten Luftstrom (Föhn) bleiben noch ca. 9 % der ursprünglichen Radioaktivitätsmenge zurück, 91 % sind also insgesamt flüchtig.

Lyophilisiert man den Durchlauf der Ionenaustauschersäule (Kapitel 3.2.8.3.), so findet man, daß ca. 80 - 90 % des gesamten Inaktivierungsmediums flüchtig sind. Dieselbe Prozedur beim Eluat der Ionenaustauschersäule ergibt, daß 80 - 100 % hiervon, also 0,8 bis 1 % der gesamten Radioaktivität nicht flüchtig sind. Gebunden werden also Leucin und eventuell andere nicht flüchtige Stoffe, nicht gebunden werden überwiegend flüchtige Stoffe.

Zusammenfassend ist festzustellen:

90 % der im Inaktivierungsmedium auftretenden Radioaktivität sind flüchtig, wenn das Medium eingeengt oder eingetrocknet wird. 25 % sind $^{14}CO_2$, die anderen 65 % wurden nicht näher charakterisiert. Möglich ist, daß es sich dabei um mehrere Stoffe handelt, da bei unterschiedlicher Prozedur unterschiedliche Mengen flüchtig sind.

3.2.8.5. Papierelektrophorese der nichtflüchtigen Bestandteile des Inaktivierungsmediums

Zur näheren Charakterisierung nichtflüchtiger Bestandteile wurden Papierelektrophoresen mit dem Inaktivierungsmedium auf zwei verschiedene Arten durchgeführt.

Das Medium wurde entweder direkt aufgetragen und das Papier mit dem Ölvakuum getrocknet oder das Medium wurde lyophilisiert, in kleinen Volumina aufgenommen, aufgetragen und mit einem kalten Luftstrom getrocknet. Die Bedingungen der Elektrophorese waren für beide Varianten identisch.

Im ersten Fall (96 % flüchtig) lassen sich ca. 0,4 % der Radioaktivität Leucin zuordnen, ca. 3,6 % sind andere nichtflüchtige Stoffe, die zum größten Teil in dem verwendeten sauren Elektrophorese-Puffer nicht wandern, also ungeladen sind. Beim Vorgehen nach der zweiten Methode (bei der die Bestimmung des flüchtigen Anteils zu 91 % mit größerer Unsicherheit behaftet ist - Quench durch Lyophilisieren), findet man ca. 3 % Leucin sowie ca. 6 % andere nichtflüchtige Bestandteile, die wiederum überwiegend um die Auftragestelle lokalisiert bleiben.

Ein Vergleich mit dem Befund bei der Ionenaustauschchromatographie (Kapitel 3.2.8.3.), wo der Leucin-Anteil zu ca. 1 % bestimmt wurde, zeigt eine recht gute Übereinstimmung der gefundenen Ergebnisse. Daß der Rest der Radioaktivität entweder flüchtig ist oder bei saurem pH bei der Elektrophorese nicht wandert, bestätigt ebenfalls die Ergebnisse der Ionenaustauschchromatographie.

In Tabelle 9 werden die Ergebnisse der Analyse des Mediums zusammengefaßt:

Tabelle 9: Radioaktive Stoffe im Inaktivierungsmedium

Flüchtige Bestandteile	CO_2	25 %
	andere	69 %
Nichtflüchtige Bestandteile	Leucin	1 %
	andere	5 %

Fazit:

Bei den nach Glucosezugabe an das Kulturmedium abgegebenen radioaktiven Stoffen (10 - 15 % der gesamten in die Zellen aufgenommenen Radioaktivität) handelt es sich fast ausschließlich um Stoffwechselprodukte des Leucins. Die Hefe Saccharomyces cerevisiae M 1 baut also nicht das gesamte angebotene Leucin in Proteine ein, sondern metabolisiert einen ganz erheblichen Teil davon.

(Ein weiteres Experiment, in dem die Fähigkeit der Hefe, Leucin zu metabolisieren, beobachtet wurde, wird in Kapitel 3.2.10. beschrieben.)

3.2.9. Charakterisierung des TCA-löslichen Anteils der Radioaktivität der Zellen

Die Charakterisierung der in das Inaktivierungsmedium abgegebenen radioaktiven Stoffe ergab, daß Leucin von Saccharomyces cerevisiae in erheblichem Ausmaß metabolisiert wird. Sie erbrachte jedoch keinen Aufschluß darüber, wie weit die Degradation von Proteinen geführt wird. Daher wurde als nächstes der TCA-lösliche Anteil der Rohextrakte untersucht.

Ergebnis dieser Untersuchung konnten der Nachweis von Oligopeptiden und freien Aminosäuren als Endprodukten der Degrada-

tion von Proteinen sowie die Bestätigung des Metabolismus von Leucin sein.

Aus Papier-Elektropherogrammen mit Aliquots des TCA-löslichen Anteils zwei Stunden nach Glucosezugabe ergab sich ein flüchtiger Anteil von ca. 34 % (im Medium über 90 %, s. Kapitel 3.2.8.4.), ein Leucin-Anteil von ca. 40 % (im Medium um 1 %) und ein Anteil anderer nichtflüchtiger Bestandteile von ca. 26 % (im Medium um 1 %).

Dünnschichtchromatogramme der TCA-löslichen Anteile von dereprimierten Zellen sowie von Zellen nach Glucosezugabe sehen ähnlich aus. Ein Unterschied besteht im Auftreten zusätzlicher Komponenten mit kleineren R_f-Werten als Leucin während der Inaktivierung. Dieser Befund deutet auf verstärkte Stoffwechselaktivität der Hefe nach Glucosezugabe.

Aus den Autoradiogrammen dieser Dünnschichtchromatogramme ist zu ersehen, daß der relativ größte Anteil der Radioaktivität an Leucin gebunden ist, da eine Schwärzung der Filme zuerst am Ort des Leucins auftritt. Mit einiger Sicherheit nimmt die Menge des radioaktiven Leucins während der Inaktivierung zu. Diese Aussage läßt sich mit der bei dieser Methode gebotenen Vorsicht aus der Intensität der Schwärzung der Autoradiogramme ziehen.

Aus der Untersuchung des TCA-löslichen Anteils der Radioaktivität der Rohextrakte ergeben sich Hinweise sowohl auf den Metabolismus von Leucin als auch auf die Degradation von Proteinen. Mit der Analyse des Inaktivierungsmediums (Kapitel 3.2.8.) wurde nachgewiesen, daß Saccharomyces cerevisiae M 1 Leucin in erheblichem Ausmaß metabolisiert. Einige Stoffwechselprodukte des Leucins sind offensichtlich für die Hefe nicht mehr von Nutzen und können die Membran passieren, sie werden an das Kulturmedium abgegeben. Eine Abgabe von Proteindegradationsprodukten - Peptiden und Aminosäuren - erfolgt dagegen nicht, sie finden sich im Cytoplasma. Dies ist, von einem teleologischen Standpunkt aus

betrachtet, auch sinnvoll, da Peptide und Aminosäuren für die Zelle wertvolle Präcursoren einer neuerlichen Proteinsynthese sind.

3.2.10. Eingriff in den Stoffwechsel mit Cycloheximid während der Derepression

In den Kapiteln 3.2.8. und 3.2.9. wird die Charakterisierung der in das Inaktivierungsmedium abgegebenen sowie der TCA-löslichen radioaktiven Stoffe beschrieben. Die Analysen wurden durchgeführt, um Rückschlüsse auf die Degradations- und Stoffwechselaktivität der Hefe während der Inaktivierungsphase zu erhalten. Nachdem ein erheblicher Metabolismus von Leucin nach Glucosezugabe festgestellt worden war, mußte geprüft werden, in welchem Ausmaß Leucin während der Derepressionsphase metabolisiert wird. Dazu wurde zum einen das normale Derepressionsmedium mit Hilfe der Papierelektrophorese untersucht. Zum anderen wurde die Derepressions-Proteinbiosynthese durch Zusatz von Cycloheximid unterbunden, um eventuell den Leucinmetabolismus bestimmen zu können, den die Hefe unabhängig von Proteinbiosynthesevorgängen aufweist. Auch hier wurde anschließend das Kulturmedium elektrophoretisch analysiert.

Bei der Derepressionskultur (Abbildung 28) nimmt der Anteil des Leucins im Medium im Lauf von 5 Stunden bis auf einen kleinen Rest ab. Daneben werden kleinere Mengen von anderen nichtflüchtigen sowie von flüchtigen Stoffen gefunden. Ungefähr 85 % der Radioaktivität werden im Verlauf der Derepression von den Zellen aufgenommen.

Bei der mit Cycloheximid versetzten Kultur (Abbildung 29) wird das Leucin während der ersten Stunde fast genauso schnell von den Zellen aufgenommen wie bei der Derepressionskultur. Danach hört die Leucinaufnahme völlig auf, der Leucingehalt im Medium verändert sich nicht mehr. Andere nicht-

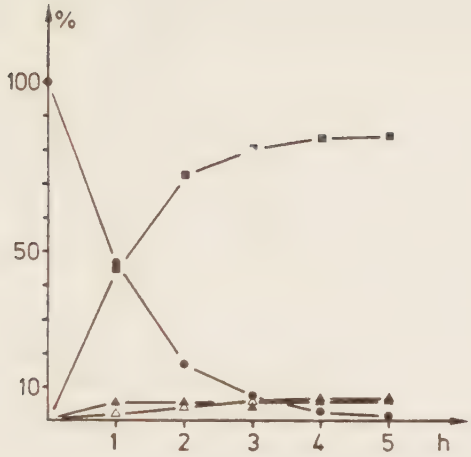

Abbildung 28: Radioaktivität in den Hefezellen und radioaktive Komponenten im Kulturmedium während der Derepression

Charakterisierung der Komponenten im Kulturmedium durch Papierelektrophorese. (■) Radioaktivität in den Zellen; (●) Leucin, (▲) sonstige nichtflüchtige Komponenten, (△) flüchtige Komponenten im Medium

flüchtige radioaktive Stoffe treten wie bei der Derepressionskultur in kleinen Mengen im Medium auf. Nach der ersten Stunde werden zunehmend flüchtige radioaktive Stoffe von den Zellen an das Kulturmedium abgegeben. Nach 5 Stunden unter Cycloheximideinwirkung liegen beinahe 40 % der gesamten Radioaktivität in Form flüchtiger Bestandteile vor. Im gleichen Maße wie die flüchtigen Anteile im Medium zunehmen, nimmt die Radioaktivität in den Zellen nach der ersten Stunde wieder ab, bis nach 5 Stunden nur noch eine geringe Restradioaktivität in der Hefe verbleibt.

Es zeigt sich, daß während der Derepression ein Metabolismus von Leucin stattfindet (ca. 15 % des gesamten angebotenen

Leucins). Bei Inhibition der Proteinbiosynthese mit Cycloheximid wird die Fähigkeit der Hefe, Leucin zu metabolisieren, sogar noch wesentlich verstärkt.

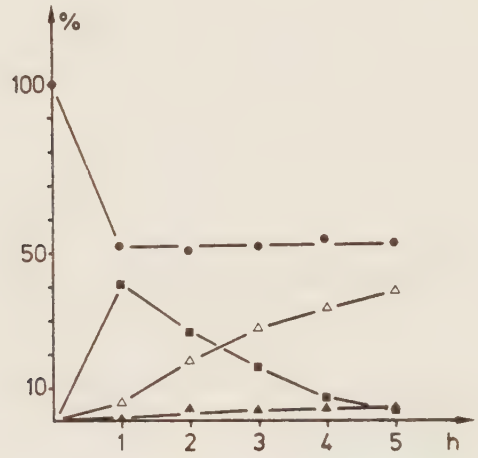

Abbildung 29: Einfluß von Cycloheximid (10 µg/ml) auf Radioaktivität in den Hefezellen und radioaktive Komponenten im Medium während der Kultur in Minimalmedium

Charakterisierung der Komponenten im Kulturmedium durch Papierelektrophorese. (■) Radioaktivität in den Zellen; (●) Leucin, (▲) sonstige nichtflüchtige Komponenten, (△) flüchtige Komponenten im Medium

3.2.11. Eingriff mit Cycloheximid während der Inaktivierung

In der Literatur werden unterschiedliche Ergebnisse bei der Frage dargestellt, ob zur Inaktivierung von Enzymen, die glucose-sensitiv sind, Proteinbiosynthese nötig ist oder nicht. Ferguson et al. (17) fanden die Inaktivierung von c-MDH in Hefe vollständig verhindert, wenn Cycloheximid in einer Konzentration von 5 µg/ml gleichzeitig mit der Glucose zugege-

ben wird, und schlossen daraus auf die Notwendigkeit von Proteinbiosynthese. Bei einer Wiederholung des Experiments (15) wurde nur eine teilweise Inhibition der Enzyminaktivierung beobachtet.

Dagegen wurde bei Verwendung einer tryptophan-auxotrophen Mutante (19), bei Verarmung an Stickstoff (15) sowie bei Verwendung einer temperatur-sensitiven Mutante (57) kein Zusammenhang zwischen Proteinbiosynthese und Enzyminaktivierung beobachtet, die Inaktivierung verlief in allen Fällen normal.

Die Verwendung von Cycloheximid als Inhibitor der Proteinbiosynthese wird von Neeff (15,57) schon problematisiert. Greig et al. (58) und McMahon (59) beschrieben bereits in früheren Jahren eine Fülle von möglichen Nebeneffekten des Cycloheximids, darunter Störungen des Glucosemetabolismus, Inhibition von DNA- und RNA-Synthese, Störungen von Zellatmung, Ionenabsorption und Aminosäureaufnahme.

Zur Abklärung der unterschiedlichen Befunde bei der Verwendung von Cycloheximid wurden die Experimente in dieser Arbeit erneut durchgeführt (Konzentration 5 µg/ml). Vor Zugabe der Glucose wurden die Zellen bereits 10 Minuten mit Cycloheximid vorinkubiert, um sicherzustellen, daß die volle Wirkung erreicht wird. Abbildung 30 zeigt, daß die Aktivität der MDH unter der Wirkung von Cycloheximid nur geringfügig abnimmt.

Die spezifische Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils bleibt ungefähr gleich (Abbildung 31). Schließlich zeigt sich die Wirkung des Cycloheximids auch noch darin, daß weniger Radioaktivität in das Medium abgegeben wird (Abbildung 32).

Eine Erklärung für diese Befunde könnte sein, daß Cycloheximid die Proteindegradation verringert oder völlig unterbindet. Eine solche Wirkung des Cycloheximids wurde bei organkultivierten Mäuseherzen nachgewiesen (60).

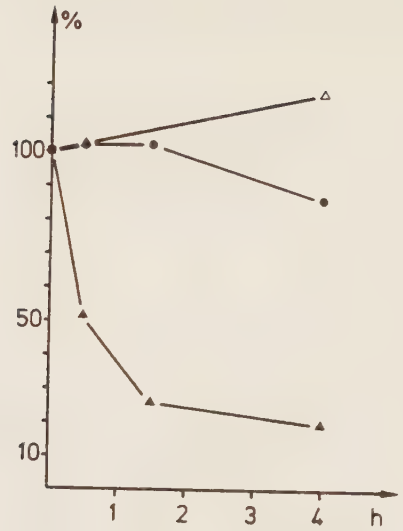

Abbildung 30

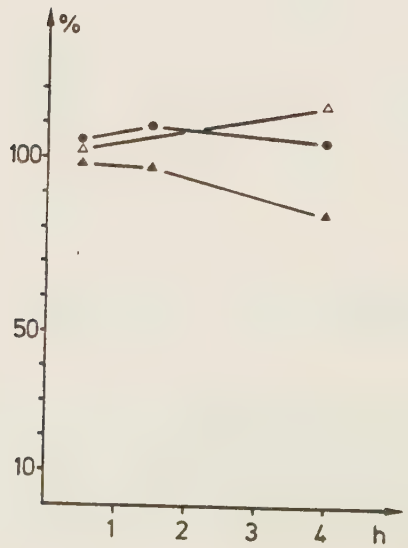

Abbildung 31

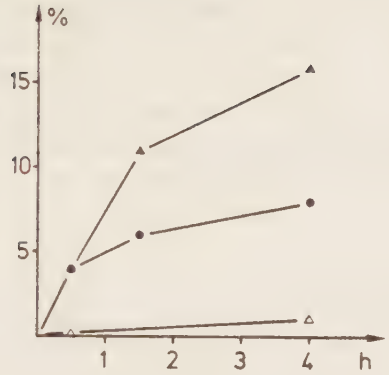

Abbildung 32: Einfluß von Cycloheximid auf die Abgabe von radioaktiven Stoffen in das Kulturmedium

Gesamt-Radioaktivität im Kulturmedium in Prozent der zu Beginn in den Zellen befindlichen Gesamt-Radioaktivität. (▲) Inaktivierung, (●) Inkubation mit Cycloheximid (5 µg/ml) und Zugabe von Glucose, (△) Kontrolle ohne Glucose

---

Abbildung 30: Einfluß von Cycloheximid auf die glucoseabhängige Enzyminaktivierung

Spezifische MDH-Aktivität bei (▲) Zugabe von Glucose, (●) Inkubation mit Cycloheximid (5 µg/ml) und Zugabe von Glucose, (△) Kontrolle ohne Glucose

Abbildung 31: Einfluß von Cycloheximid auf die proteingebundene Radioaktivität der Rohextrakte

(▲) Zugabe von Glucose, (●) Inkubation mit Cycloheximid (5 µg/ml) und Zugabe von Glucose, (△) Kontrolle ohne Glucose

Zum einen hebt diese Erklärung den vermeintlichen Widerspruch in den oben beschriebenen früheren Experimenten auf: Die beobachtete Wirkung des Cycloheximids beruht in diesem Fall nicht auf einer Hemmung der Proteinbiosynthese, wie Ferguson et al. angenommen hatten. Die glucoseabhängige Enzyminaktivierung erfordert keine Proteinbiosynthese. Die Ergebnisse von Duntze und Neeff sind damit nicht mehr in Frage gestellt.

Zum anderen stellt diese Erklärung einen Zusammenhang zwischen der Degradation von Protein und der Inaktivierung der glucose-sensitiven Enzyme her. Bei Verhinderung der Proteindegradation löst Glucose die Inaktivierung der c-MDH nicht mehr aus (Abbildung 30).

3.2.12. Verwendung anderer Hefestämme zur Untersuchung des Proteinturnovers und der glucoseabhängigen Enzyminaktivierung

Im Lauf der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, daß der Stamm Saccharomyces cerevisiae M 1 das zur Proteinmarkierung angebotene Leucin entgegen der früheren Annahmen doch zu einem erheblichen Teil metabolisiert (s. Kapitel 3.2.8., 3.2.9. und 3.2.10.).

Dies führt dazu, daß die größtmögliche Markierung der Proteine nicht erreicht und der Nachweis von Endprodukten der Proteindegradation erschwert wird.

Als Möglichkeit, diese Nachteile zu vermeiden, bot sich die Verwendung leucin-auxotropher Stämme an. Im Idealfall sollten solche Stämme das angebotene Leucin bei entsprechender Dosierung vollständig ins Protein einbauen und nicht metabolisieren.

Untersucht wurden zunächst zwei leucin-auxotrophe Stämme (27). Bei beiden kann eine ausgeprägte Derepression der

MDH-Aktivität beobachtet werden. Im Vergleich zum Stamm Saccharomyces cerevisiae Z9.8A-3C werden beim Stamm Saccharomyces cerevisiae SMC-19A höhere MDH-Aktivitäten in kürzerer Zeit erreicht (Erhöhung der MDH-Aktivität um den Faktor 7 in ca. 11 Stunden). Deshalb wurde für die weitere Charakterisierung der Derepression und Inaktivierung in einem leucin-auxotrophen Stamm Saccharomyces cerevisiae SMC-19A verwendet.

Auffällig ist, daß die MDH-Aktivität nach der Glucosezugabe nicht wieder auf den Repressionswert abnimmt (Abbildung 33). Diese Beobachtung war Anlaß für eine Untersuchung des Isoenzymmusters dieses Stammes. Rohextrakte aus reprimierten und dereprimierten Zellen wurden der Affinitätschromatographie an Dextranblau-Sepharose nach Hägele (34) und Nauhaus (20) unterworfen, um den Gehalt an mitochondrialer

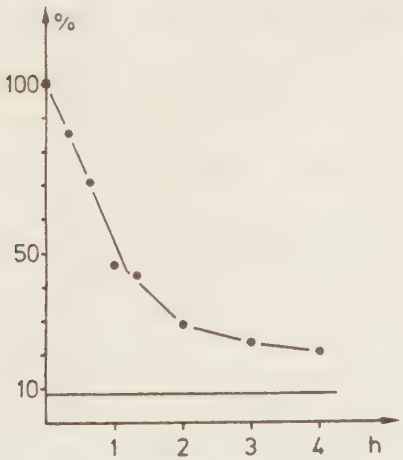

Abbildung 33: Inaktivierung der MDH-Aktivität in dem leucin-auxotrophen Hefestamm Saccharomyces cerevisiae SMC-19A in Minimalmedium

Nach 12-stündiger Derepression wurde die Inaktivierung durch Zugabe von Glucose ausgelöst. Die Aktivität wurde nach 2.3.7.1. gemessen. Die Parallele zur Abszisse zeigt die spezifische Aktivität der MDH in reprimierten Zellen an.

und cytoplasmatischer MDH zu bestimmen (Tabelle 10). Reprimierte Zellen enthalten ausschließlich m-MDH, 12 Stunden dereprimierte Zellen 62 % c-MDH und 38 % m-MDH.

Die absolute Menge an m-MDH in jeweils gleichen Mengen Hefezellen steigt während der Derepressionsdauer um den Faktor 3 an; mit anderen Worten in dem untersuchten Stamm wird neben der c-MDH auch die m-MDH dereprimiert bzw. aktiviert.

Tabelle 10: Derepression der MDH-Aktivität in dem leucin-auxotrophen Stamm SMC-19A. Berechnung der Zunahme des mitochondrialen Isoenzyms

	Spez. Aktivität reprimierter Zellen (U/mg)	Spez. Aktivität 12 h dereprimierter Zellen (U/mg)	Anstieg um den Faktor
Rohextrakt	0,21	1,62	7,7
Anteil m-MDH	0,21	0,63	3,0
Anteil c-MDH	0	1,03	-
Addition zur Probe	0,21	1,66	7,9

Damit unterscheidet sich der Stamm SMC-19A ganz erheblich von dem in diesem Labor bisher verwendeten und gut charakterisierten Stamm Saccharomyces cerevisiae M 1. Eine Deutung von Befunden zu Proteinturnover und Stoffwechsel im Zusammenhang mit Derepression und Inaktivierung von MDH dürfte aufgrund der Variabilität beider Isoenzyme auf erhebliche Schwierigkeiten stoßen. Ergebnisse bezüglich Proteinturnover und Stoffwechsel im Stamm Saccharomyces cerevisiae SMC-19A dürften nicht ohne weiteres mit denen im Stamm Saccharomyces cerevisiae M 1 vergleichbar sein.

Bei der Prüfung der Eignung des leucin-auxotrophen Stammes mußte als zweites die minimal erforderliche Leucinkonzentration festgestellt werden, mit der dieser Stamm noch die volle Derepressionsleistung erbringt. Dies ist notwendig, um bei voller Derepressions-Proteinsynthese maximalen Einbau von radioaktiv markiertem Leucin ins Protein und einen möglichst geringen Metabolismus des Leucins erreichen zu können.

Wurden die Zellen auf dem komplexen Optimalmedium nach Wickerham gezüchtet und anschließend auf das übliche Minimalmedium umgesetzt, war überraschenderweise normale Derepression auch völlig ohne zugesetztes Leucin zu beobachten, während ein Wachstum solcherart dereprimierter wie auch reprimierter Zellen ohne Leucin nicht möglich war.

Dieser Effekt kann entweder dadurch erklärt werden, daß die Hefezellen aus der Wachstumsphase auf Wickerham-Medium einen so großen Aminosäure- (und damit auch Leucin-) Pool mitbringen, daß die gesamte Derepression der Glyoxylatzyklus-Enzyme damit bestritten werden kann, oder dadurch, daß der für die Derepression benötigte Nachschub an Leucin aus Degradationsvorgängen stammt.

Ein Versuch, das Ansammeln von Leucin zu vermeiden, bestand darin, daß die Zellen auf einem definierten Medium mit Leucin angezogen wurden und ca. zwei Generationszeiten vor Erreichen der stationären Phase auf dasselbe Medium ohne Leucin umgesetzt wurden. Die Zellen sollten weiterwachsen bis der Leucin-Pool verbraucht war. Mit solcherart an Leucin verarmten Zellen sollten anschließend die Versuche zur Ermittlung der minimalen Leucin-Konzentration während der Derepression durchgeführt werden.

Die tatsächlich bis zur Beendigung des Wachstums beobachtete Zunahme der Zellzahl (um 20 %) nach Absetzen des Leucins kommt durch Abtrennung schon angefangener Knospen zustande. Ein echtes Wachstum findet nicht mehr statt.

Dieser Befund läßt zwei Deutungen zu:

- Eine Verarmung an Leucin ist auf diesem Weg nicht zu erreichen. Das Fehlen von Leucin löst ein Signal zur Beendigung des Wachstums aus.

- Der verwendete Hefestamm ist nicht in der Lage, einen nennenswerten Leucin-Pool anzulegen, so daß er sofort nach Absetzen von Leucin an dieser Aminosäure "verarmt" ist. Trifft diese Deutung zu, würde das bedeuten, daß das für die Derepression benötigte Leucin durch Degradation von unter diesen Kulturbedingungen nicht erforderlichen Proteinen zur Verfügung gestellt wird.

Die absolute Notwendigkeit von zugesetztem Leucin für die Derepressions-Proteinbiosynthese ließ sich damit nicht nachweisen.

Angesichts dieser letzten nicht entschiedenen Frage sowie der oben erwähnten unterschiedlichen Isoenzymmuster und der daraus folgenden Konsequenzen wurde darauf verzichtet, mit dem leucin-auxotrophen Stamm Markierungsexperimente durchzuführen.

4. DISKUSSION

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zur Degradation von Protein und zum Stoffwechsel in Saccharomyces cerevisiae erhalten ihren Stellenwert dadurch, wie sie sich in die in der Hefezelle gegebenen Bedingungen einordnen lassen.

Voraussetzungen:

Glucose-sensitiv im Sinne einer irreversiblen Inaktivierung, die kein inaktives Enzymprotein zurückläßt, ist nur ein relativ kleiner Teil des gesamten Zellproteins. Nach einer Schätzung von Hägele (61) beträgt der Anteil der c-MDH am gesamten löslichen Protein in voll dereprimierten Zellen maximal 1 %. Dies ist im Vergleich zu anderen Proteinen ein sehr hoher Anteil. Rechnet man alle anderen bisher bekannten glucose-sensitiven Proteine (2,5,6,7,8,9,10,62) mit höchstens gleich großen Anteilen hinzu, so sind allenfalls 5 % des gesamten Zellproteins von der glucoseabhängigen Inaktivierung betroffen.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurden Rohextrakte markierter Derepressions- und Inaktivierungskulturen mit Disc-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und SDS-Disc-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt. Weder mit Hilfe der Proteinanfärbung noch mit Hilfe von Autoradiogrammen konnte das Verschwinden diskreter Proteinbanden oder eine allgemeine starke Abnahme des markierten Proteins im Verlauf der Inaktivierungskultur beobachtet werden. Vorausgesetzt, es handelt sich bei der glucoseabhängigen Inaktivierung um die Degradation von Proteinen, so bestätigt das Ergebnis dieses Experiments die obige Schätzung, daß die glucoseabhängige Inaktivierung nur einen kleinen Teil des gesamten Zellproteins betrifft.

Neben den glucose-sensitiven Proteinen wird während der De-

repressionsphase natürlich eine Vielzahl anderer Proteine synthetisiert (und damit auch mit radioaktivem Leucin markiert). Das Verhältnis zwischen neugebildeten glucose-sensitiven und neugebildeten sonstigen Proteinen war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Der Markierungsgrad der dereprimierten glucose-sensitiven Proteine und damit auch die absolut meßbare Degradation (Radioaktivität in cpm) während der Inaktivierungsphase hängt von diesem Verhältnis ab. Je mehr sonstige Proteine während der Derepressionsphase synthetisiert werden, desto kleiner sind die meßbaren Effekte der durch Glucose ausgelösten Degradation.

Des weiteren können die absoluten Differenzen der Gesamt-Radioaktivitäten der TCA-fällbaren Anteile dadurch verringert werden, daß markierte membran- oder partikelgebundene Proteine nach dem Zellaufschluß nicht extrahiert und somit ihre Radioaktivitäten auch nicht gemessen werden.

Es sei an dieser Stelle ausdrücklich betont, daß die genannten Effekte keinen Einfluß auf die Degradationsrate, sondern lediglich auf die absolute Größe der Meßwerte haben. Die Degradationsrate (errechnet aus der relativen Differenz der Meßwerte) ist dann mit ausreichender Genauigkeit zu bestimmen, wenn so viel radioaktives Leucin angeboten wird, daß die absolute Differenz der Meßwerte signifikant ist. (Der Fehler bei der Bestimmung der TCA-fällbaren Anteile - 4 Pipettier- und 3 Waschvorgänge - kann ± 5 % betragen.)

Proteindegradation:

Aus den in den Kapiteln 3.2.2. und 3.2.3. beschriebenen Experimenten geht hervor, daß durch Zugabe von Glucose zu dereprimierten Zellen eine erhöhte Degradation von Protein ausgelöst wird. Die Messung der Gesamt-Radioaktivität des TCA-fällbaren Anteils der Rohextrakte zeigt direkt die Degradation markierten Proteins an. Der Vergleich der entsprechenden spezifischen Radioaktivität mit dem Proteingehalt

der Zellen führt auf indirektem Weg zu demselben Ergebnis. Die spezifische Radioaktivität nimmt nicht allein durch die Neusynthese unmarkierten Proteins, sondern auch durch Degradation markierten Proteins in der beobachteten Weise ab.

Das Ausmaß der Proteindegradation nach Zugabe von Glucose zu dereprimierten Zellen ist unter Mangelbedingungen (in Puffer) deutlich größer als in Minimalmedium. Dieser Befund stimmt mit den Beobachtungen verschiedener Autoren überein, wonach bei der Inkubation von Hefe unter Mangelbedingungen erhöhte proteolytische Aktivitäten auftreten (52,53,54,55,56).

Die durchschnittliche Degradationsrate aller markierten Proteine in Minimalmedium während der ersten zwei Stunden nach Zugabe von Glucose beträgt -5,3 (±0,3) pph. Ohne Glucose ist sie geringer: -4,0 (±0,2) pph. Wird die sich überlagernde Degradation glucose-sensitiver und glucose-insensitiver Proteine durch geeignete Versuchsführung (Chase-Derepression vor der Chase-Inaktivierung) "entzerrt", kann die Degradationsrate der glucose-sensitiven Proteine allein gemessen werden. Sie beträgt -2,7 (±0,1) pph. In 4 Stunden werden demnach knapp 11 % der markierten Proteine abgebaut, die vor Zugabe von Glucose (Beginn der Chase-Inaktivierung) noch in der Zelle vorlagen. Dies entspricht ca. 13 % aller Proteine, die nach Beendigung der Pulse-Markierung radioaktiv markiert waren.

Das bedeutet: Die glucose-sensitiven Proteine machen 13 % aller in 5-stündiger Derepressionskultur markierten Proteine aus. Sie werden innerhalb von 4 Stunden nach Zugabe von Glucose wieder abgebaut. In derselben Zeitspanne läuft die glucoseabhängige Enzyminaktivierung praktisch vollständig ab (s. Kapitel 3.1.2., Abbildung 2). Der Schluß liegt deshalb nahe, daß die Inaktivierung der glucose-sensitiven Enzyme durch proteolytischen Abbau zustande kommt.

Aus dem Chase-Derepression/Chase-Inaktivierung-Experiment ist weiterhin zu ersehen, daß 17 % des gesamten markierten Proteins kurzlebige glucose-insensitive Proteine sind. Die

restlichen 70 % des gesamten markierten Proteins sind sehr stabile glucose-insensitive Proteine, die während des Beobachtungszeitraums nicht meßbar degradiert werden.

Während der 5-stündigen Derepression mit Pulse-Markierung werden somit glucose-sensitive und glucose-insensitive Proteine im Verhältnis 13 zu 87 synthetisiert.

Legt man die eingangs dieser Diskussion dargelegte Schätzung zugrunde, nach der 5 % des gesamten Zellproteins von der glucoseabhängigen Inaktivierung betroffen sind, so ergibt sich der in Tabelle 11 gezeigte Zusammenhang zwischen markiertem Protein und Gesamtprotein.

Tabelle 11: Anteil der in 5-stündiger Derepressionskultur synthetisierten Proteine am gesamten Zellprotein

Berechnung aus den mit Hilfe des Chase-Derepression/Chase-Inaktivierung-Experiments gewonnenen Degradationsraten unter der Annahme, daß der Anteil der glucose-sensitiven Proteine am gesamten Zellprotein 5 % beträgt

Während der Derepressionsphase synthetisierte Proteine	Anteil am gesamten markierten Protein	Anteil am gesamten Zellprotein
glucose-sensitiv	13 %	5 %
glucose-insensitiv	87 %	33,5 %
davon langlebig	70 %	27 %
davon kurzlebig	17 %	6,5 %
gesamt	100 %	38,5 %

Nach dieser Berechnung wäre also gut ein Drittel des gesamten Zellproteins im Lauf von 5 Stunden Derepressionskultur markiert worden. Der tatsächliche Anteil der markierten Proteine am gesamten Zellprotein ist nicht bekannt, jedoch erscheint die Größenordnung dieses Wertes durchaus vernünftig.

Eine einfache Rückrechnung ergibt, daß bei einem Anteil der markierten Proteine am gesamten Zellprotein von 20 % (50 %) ein solcher der glucose-sensitiven Proteine von 2,6 % (6,5 %) resultiert. Dieses Rechenexempel zeigt, daß die Größenordnung des Anteils der glucose-sensitiven Proteine am Gesamtprotein richtig eingeschätzt wurde.

Aus den in Kapitel 3.2.11. beschriebenen Experimenten mit Cycloheximid ergibt sich ein weiterer Hinweis auf den Zusammenhang zwischen Proteindegradation und glucoseabhängiger Enzyminaktivierung. Cycloheximid verhindert in Hefe die Degradation von Protein und gleichzeitig die Inaktivierung der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase nach Zugabe von Glucose.

Neben glucose-sensitiven Proteinen, die während der Derepressionsphase synthetisiert wurden, unterliegen auch noch andere Proteine, die während der Anzucht der Zellen synthetisiert wurden, der durch Glucose ausgelösten Proteindegradation. Diese ist also nicht spezifisch bezüglich der dereprimierbaren/inaktivierbaren Proteine. Dies geht aus dem in K itel 3.2.6. beschriebenen Experiment der Doppelmarkierung von Hefezellen während des Wachstums und während der Derepressionskultur hervor. Möglich ist jedoch, daß die dereprimierbaren Proteine von der Degradation besonders stark betroffen werden, wenn sie besonders protease-sensitiv sind (22,23,24,25).

Die vereinfachte Methode zur Bestimmung der Radioaktivität der TCA-fällbaren Anteile, die in der vorliegenden Arbeit routinemäßig angewendet wurde, ergibt (zumindest für Hefe unter den gewählten Bedingungen) verläßliche Werte für den Gehalt der Rohextrakte an markiertem Protein. Eine nennenswerte Verfälschung der Ergebnisse durch radioaktiv markierte Nucleinsäuren und Lipide tritt nicht auf. Dies wurde durch Vergleich mit der Methode nach Mans und Novelli (45)

abgesichert (Kapitel 3.2.2.2.). Die routinemäßig angewandte Methode umfaßt weniger Wasch- und Extraktionsschritte als die Methode nach Mans und Novelli, sie ist einfacher und schneller durchzuführen.

Metabolismus von Leucin:

Die Suche nach Degradationsprodukten der markierten Proteine (Peptide, Aminosäuren) führte nur zu schwachen Evidenzen bei der Charakterisierung des TCA-löslichen Anteils der Rohextrakte. Diese Charakterisierung und vor allem die der in das Inaktivierungsmedium abgegebenen radioaktiven Stoffe (Kapitel 3.2.8.) ergab jedoch, daß Leucin entgegen der früheren Annahmen durch den verwendeten Hefestamm in größerer Menge metabolisiert wird. Während der Derepressionsphase werden ca. 15 % des angebotenen Leucins in flüchtige und nichtflüchtige Komponenten umgewandelt, während der Inaktivierungsphase in Puffer noch einmal ca. 10 - 15 % der gesamten in die Zelle aufgenommenen Radioaktivität in Form von ^{14}C-Kohlendioxid und anderer flüchtiger sowie nichtflüchtiger Komponenten an das Kulturmedium abgegeben. Insgesamt werden somit im Lauf von 5 Stunden Derepressions- und 2 Stunden Inaktivierungskultur über 20 % des gesamten zu Beginn angebotenen Leucins metabolisiert.

Bei der Inaktivierung in Minimalmedium wird weniger Radioaktivität in das Kulturmedium abgegeben. Dies kann entweder von einem geringeren Metabolismus des Leucins herrühren oder aber dadurch zustandekommen, daß die Stoffwechselprodukte des Leucins in geringerem Maße in das Kulturmedium gelangen.

Die Tatsache, daß Leucin während der Derepressionsphase metabolisiert wird, hat zur Folge, daß der Markierungsgrad der Proteine nicht maximal ist. Wie oben diskutiert, impliziert dies, daß eine erhöhte Menge an radioaktivem Leucin angeboten werden muß.

Der Metabolismus von Leucin durch den Hefestamm Saccharomyces cerevisiae M 1 schafft zwei Probleme:

1) Die größtmögliche Markierung der Proteine wird nicht erreicht. Auf die Bestimmung der Degradationsraten hat dies bei ausreichendem Angebot an radioaktivem Leucin keinen Einfluß. Die Experimente werden jedoch durch den unter Umständen erforderlichen erhöhten Leucineinsatz teurer.

2) Der direkte Nachweis von Endprodukten der Proteindegradation wird schwieriger, je komplexer das Gemisch ist, in dem sie sich befinden.

Deshalb wurden zwei leucin-auxotrophe Hefestämme auf ihre Eignung für Markierungsexperimente im Zusammenhang mit der Untersuchung der glucoseabhängigen Enzyminaktivierung geprüft: Kapitel 3.2.12. Aus Gründen, die dort ausführlich diskutiert werden, wurde auf solche Experimente mit diesen Stämmen verzichtet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß das Ausmaß der Degradation von Protein nach Zugabe von Glucose zu dereprimierten Zellen nicht sehr groß, aber signifikant nachweisbar ist (ohne Glucose findet eine geringere Proteindegradation statt). Größere Effekte als die gemessenen waren von vornherein nicht zu erwarten. Neben dem direkten Nachweis der Degradation von Protein wurde versucht, eine indirekte Bestätigung durch den Nachweis von Degradationsprodukten zu finden. Alle Ansätze dazu führten in der Hauptsache jedoch nicht zu dem erhofften Ergebnis, sondern zu der Erkenntnis, daß der verwendete Hefestamm Leucin in erheblichem Maß metabolisiert. Um diese unerwünschte Begleiterscheinung zu vermeiden, wurde die Verwendbarkeit leucin-auxotropher Stämme untersucht. Sie erwiesen sich als für die vorgesehenen Markierungsexperimente nicht geeignet.

Glucoseabhängige Enzyminaktivierung:

Die Bestimmung von Proteingehalt und Zellzahl ergibt, daß die beobachtete Abnahme der spezifischen Aktivität der MDH nicht durch das Zellwachstum allein zustandekommt, sondern daß es sich dabei um eine echte Inaktivierung handelt.

Die Kinetik der MDH-Inaktivierung folgt einer Exponentialfunktion. Im Gegensatz dazu verläuft die Degradation der glucose-sensitiven Proteine annähernd linear. Ob die Proteindegradation für die Inaktivierung verantwortlich ist oder nicht, läßt sich aus diesen Beobachtungen allerdings nicht entscheiden. Der Verlust der Aktivität eines Enzyms kann im Extremfall schon durch die Abspaltung eines einzigen Aminosäure-Restes erfolgen, so daß die Enzymaktivität abnimmt, während die Proteinmenge noch nicht meßbar weniger geworden ist.

Die unterschiedlichen Proteindegradationsraten in Minimalmedium bzw. in Puffer stehen in keinem Zusammenhang mit der Kinetik der MDH-Inaktivierung. Die höhere Degradationsrate in Puffer trifft offensichtlich andere als die glucose-sensitiven Proteine. Sie dürfte ihre Ursache in den Mangelbedingungen der Hefe in Puffer ohne exogene Stickstoffquelle haben.

Eine Überlegung zu Beginn der vorliegenden Arbeit galt dem Modell der "Katabolit-Inaktivierung" (13). Nach diesem Modell sollen Katabolite der Glucose (oder Fructose oder Mannose) direkt oder über einen Effektor eine Konformationsänderung der c-MDH bewirken, so daß sie sensitiv für die Aufnahme in Vakuolen durch Autophagie würde. In den Vakuolen soll dann Degradation durch die dort lokalisierten Proteasen stattfinden.

Sollten die Hexosekatabolite direkt die Konformationsände-

rung bewirken, so wäre denkbar, daß dies durch Bindung der Katabolite an die Enzymmoleküle eingeleitet wird. Um nun die Katabolite und eventuelle Bruchstücke der c-MDH identifizieren zu können, käme die Verwendung radioaktiv markierter Glucose zur Inaktivierung und "Kennzeichnung" der c-MDH, anschließend eine schnelle Anreicherung der so markierten c-MDH und schließlich der Versuch eines Nachweises des Markers und der Bruchstücke in Frage. Eine einfache Berechnung unter der Annahme, daß pro Molekül c-MDH ein Molekül radioaktiver Glucose zur Markierung nötig ist, zeigte allerdings, daß dieser Versuchsansatz in der Praxis nicht sinnvoll ist. Die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses des Versuches steht zum Arbeits- und Kostenaufwand (die benötigte Menge an radioaktiv markierter Glucose liegt für ^{14}C im Millicurie-Bereich) in einem so ungünstigen Verhältnis, daß von diesem Experiment abgesehen wurde.

Die Wahrscheinlichkeit eines negativen Ausgangs dieses Versuches folgt aus den Beobachtungen von Hägele (34), wonach nicht nur bei katabolem Glucoseumsatz, sondern auch bei einer bestimmten Äthanol-Umsatzrate in Abwesenheit eines katabolen Glucosestoffwechsels metabolische Bedingungen einstellbar sind, die zu einer Verminderung der intrazellulären MDH-Konzentration führen. Umgekehrt findet trotz Anwesenheit von Glucose nicht unter allen Bedingungen eine Inaktivierung von als glucose-sensitiv bekannten Enzymen statt (2,3). Die Suche nach einem oder dem Glucosekatabolite, der ein spezifisches inaktivierendes System induziert oder aktiviert, wird deshalb sehr wahrscheinlich nicht zum Erfolg führen.

Hägele führt aus, daß die Enzymkonzentration unter allen Kulturbedingungen wahrscheinlich durch das Ausmaß von Proteinsynthese und von Proteindegradation quantitativ reguliert wird. Dabei postuliert er einen enzymspezifischen Turnover durch Derepression sowie Repression verbunden mit enzymspezifischem proteolytischem Abbau und deutet Wege an, wie dieser enzymspezifische Turnover zu messen sei: mit

Hilfe von Pulse-Chase-Experimenten und rascher Isolierung der c-MDH unter den verschiedenen Kulturbedingungen mit spezifischen Antiseren sowie mit Hilfe der one-step-Reinigung (34,20).

Ein Vergleich der so gewonnenen Daten mit dem allgemeinen Proteinturnover in Hefe unter den verschiedenen Kulturbedingungen soll dann Aufschluß darüber geben, ob der Turnover der c-MDH integraler Bestandteil des allgemeinen Turnovers in der Zelle ist oder über eine spezifische Regulation verfügt.

Zur Messung des enzymspezifischen Turnovers nach den Vorschlägen von Hägele muß bemerkt werden, daß die erwähnte one-step-Reinigung nicht zum Ziel führen wird. Die "Affinitätschromatographie" an Dextranblau-Sepharose ist für eine Enzymreinigung ein sehr effektiver Anreicherungsschritt. Sie ist in relativ kurzer Zeit durchzuführen, und immerhin 50 % oder mehr der so erhaltenen Präparation sind c-MDH. Für die Bestimmung des Turnovers eines individuellen Enzyms ist diese Reinheit jedoch bei weitem nicht ausreichend, wünschenswert wäre eine mindestens 90-prozentige Reinheit. Eine noch kürzere Zeitspanne zwischen der Herstellung des Rohextraktes und der Abtrennung der c-MDH von allen übrigen Komponenten des Rohextraktes wäre ebenfalls von Vorteil für die Messung einer möglichst korrekten Kinetik der Enzymdegradation. Diesen Anforderungen wird allein eine Affinitätschromatographie gerecht, die an einer mit monospezifischen Antikörpern modifizierten Matrix durchgeführt wird.

Die Methodik zur Reinigung der c-MDH ist bekannt (34,48). Mit hochreinem Enzym können Antiseren produziert werden. Monospezifische Antikörper (63,64) können nach dem Prinzip der Antiserum-Absorption (65,66,64,67) gewonnen und nach der Methode von Cuatrecasas (68,69) an Sepharose gekoppelt werden. Damit sind sämtliche Voraussetzungen für die Bestimmung des spezifischen Turnovers der c-MDH gegeben.

Der allgemeine Proteinturnover in Hefe unter verschiedenen Kulturbedingungen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die hierbei gemachten Befunde stützen die Hypothese, daß für die glucoseabhängige Enzyminaktivierung proteolytische Vorgänge in Frage kommen.

Der Vergleich der enzymspezifischen Daten mit denen des allgemeinen Proteinturnovers kann keine Auskunft darüber geben, wie die glucoseabhängige Enzyminaktivierung reguliert wird und wie ihre Spezifität zustandekommt. Dieser Vergleich kann jedoch die Hypothese endgültig bestätigen oder widerlegen, daß die glucoseabhängige Enzyminaktivierung auf raschem proteolytischem Abbau der betroffenen Enzyme beruht.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1) Nach Zugabe von Glucose zu dereprimierten (in Minimalmedium mit Acetat als einziger Kohlenstoffquelle kultivierten) Hefezellen des Stammes Saccharomyces cerevisiae M 1 werden die glucose-sensitiven Enzyme inaktiviert. Diese Inaktivierung findet sowohl unter Wachstumsbedingungen (in Medium mit Stickstoffquelle) als auch unter Mangelbedingungen (in Puffer ohne Stickstoffquelle) statt. Untersucht wurde dies am Beispiel der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase und der Fructose-1,6-bisphosphatase.

2) Die Zugabe von Glucose löst eine erhöhte Degradation von Protein aus. Die Proteindegradation wurde über die Abnahme der Radioaktivität des Proteins bestimmt, das während der Derepressionsphase radioaktiv markiert worden war. Der Nachweis der Degradation erfolgte direkt durch die Bestimmung der gesamten proteingebundenen Radioaktivität der Rohextrakte und indirekt durch die Bestimmung der spezifischen Radioaktivität des Proteinanteils der Rohextrakte.

3) Die durchschnittliche Degradationsrate aller markierten Proteine beträgt bei der Inaktivierung in Minimalmedium - 5,3 pph (Prozent pro Stunde), die der glucose-sensitiven Proteine allein - 2,7 pph. Dieser Befund stützt die Hypothese, daß für die glucoseabhängige Enzyminaktivierung proteolytische Vorgänge verantwortlich sind. Bei der Inaktivierung in Puffer beträgt die durchschnittliche Degradationsrate aller markierten Proteine - 10,0 pph. Der im Vergleich zur Inaktivierung in Minimalmedium höhere Wert findet eine Erklärung darin, daß in Hefe unter Mangelbedingungen erhöhte proteolytische Aktivitäten auftreten.

4) Die durch Glucose ausgelöste Proteindegradation ist nicht spezifisch bezüglich der dereprimierbaren/inaktivierbaren Proteine, sondern betrifft auch Proteine, die schon während der Anzucht der Zellen (vor der Derepressionskultur) synthetisiert wurden.

5) Cycloheximid hemmt die Enzyminaktivierung sehr stark. Die Degradation von Protein wird völlig unterbunden. Dies ist ein weiterer Hinweis auf den Zusammenhang zwischen Proteindegradation und Enzyminaktivierung. Es wird eine widerspruchsfreie Erklärung für die Wirkung des Cycloheximids und die Rolle der Proteinbiosynthese bei der glucoseabhängigen Enzyminaktivierung gegeben.

6) Zur Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität wurde ein Verfahren entwickelt, das einfacher und schneller durchzuführen ist als die etablierte Methode nach Mans und Novelli. Die beiden Methoden werden verglichen.

7) Die Hefe Saccharomyces cerevisiae M 1 metabolisiert Leucin in erheblichem Ausmaß. Die Bedeutung dieses Befunds für die Untersuchung des Proteinturnovers mit Hilfe von Markierungsexperimenten wird diskutiert. Die Stoffwechselprodukte des Leucins wurden charakterisiert.

8) Zwei leucin-auxotrophe Hefestämme wurden auf ihre Eignung für Markierungsexperimente zur Bestimmung des Proteinturnovers im Zusammenhang mit der glucoseabhängigen Enzyminaktivierung untersucht.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Epps, H.M.R. & Gale, E.F., Biochem. J. 36, 619-623 (1942)

2. Spiegelman, S. & Reiner, J.M., J. Gen. Physiol. 31, 175-193 (1947)

3. Neidhardt, F.C. & Magasanik, B., Nature 178, 801-802 (1956)

4. Magasanik, B., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26, 249-256 (1961)

5. Robertson, J.J. & Halvorson, H.O., J. Bacteriol. 73, 186-198 (1957)

6. Witt, I., Kronau, R. & Holzer, H., Biochim. Biophys. Acta 118, 522-537 (1966)

7. Görts, C.P.M., Biochim. Biophys. Acta 184, 299-305 (1969)

8. Gancedo, C., J. Bacteriol. 107, 401-405 (1971)

9. Gancedo, C., Schwerzmann, K. & Molano, J., Proc. 4th Intern. Symp. Yeasts. p. 9, Abstr. A 5 (1974)

10. van Rijn, J. & van Wijk, R., J. Bacteriol. 110, 477-484 (1972)

11. Schamhart, D.H.J., van den Heijkant, M.P.M. & van de Poll, K.W., J. Bacteriol. 130, 526-528 (1977)

12. Gancedo, C. & Schwerzmann, K., Arch. Microbiol. 109, 221-225 (1976)

13. Holzer, H., TIBS 1, 178-181 (1976)

14. Neeff, J., Dissertation, Biologische Fakultät der Universität Freiburg (1974)

15. Neeff, J. & Mecke, D., Arch. Microbiol. 115, 55-60 (1977)

16. Switzer, R.L., Ann. Rev. Microbiol. 31, 135-157 (1977)

17. Ferguson, J.J., Boll, M. & Holzer, H., Eur. J. Biochem. 1, 21-25 (1967)

18. Bechet, J. & Wiame, J.M., Biochem. Biophys. Res. Commun. 21, 226-234 (1965)

19. Duntze, W., Neumann, D. & Holzer, H., Eur. J. Biochem. 3, 326-331 (1968)

20. Nauhaus, J., Dissertation, Fachbereich Biologie der Universität Tübingen (1977)

21. Neeff, J., Hägele, E., Nauhaus, J., Heer, U. & Mecke, D., Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 276-282 (1978)

22. Molano, J. & Gancedo, C., Eur. J. Biochem. 44, 213-217 (1974)

23. Jusic, M., Hinze, H. & Holzer, H., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 735-740 (1976)

24. Neeff, J., Hasilik, A. & Mecke, D., Abstr. 9th FEBS-Meeting, Budapest, p. 90 s.2 s.5, published by the Hungarian Biochemical Society (1974)

25. Mecke, D. & Neeff, J. in Limited Proteolysis in Microorganisms (Cohen, G.N. & Holzer, H., eds.), US Dept. of Health, Education, and Welfare (1979)

26. Duntze, W. (Ruhr-Universität Bochum), Stamm Saccharomyces cerevisiae M 1, wahrscheinlich triploider Hefestamm, isoliert in den Laboratorien von Prof. Linnane, Monash University, Dept. of Biochemistry, Clayton, Victoria, Australien

27. Zimmermann, F.K. (Technische Hochschule Darmstadt),
a) Stamm Saccharomyces cerevisiae SMC-19A$^{\alpha}_{\text{leu 1}}$ MAL 2-8^{C} MAL 3Suc3
b) Stamm Saccharomyces cerevisiae Z9.8A-3C$^{\alpha}_{\text{leu 1}}$ MAL 2-8^{C} abgeleitet durch Kreuzungen aus Stämmen des Dept. of Genetics of the University of Washington, Seattle, Washing-

28. Wickerham, L.J., US Dept. Agric. Tech. Bull. No. 1209 (1951)

29. Zimmermann, F.K., Khan, N.A. & Eaton, N.R., Molec. Gen. Genet. 123, 29-41 (1973)

30. Kohlhaw, G., Drägert, W. & Holzer, H., Biochem. Z. 341, 224-238 (1965)

31. Lowry, H.O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J., J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

32. Wolfe, R.G. & Neilands, J.B., J. Biol. Chem. 221, 61-69 (1956)

33. Bergmeyer, H.U. (Hrsg.), Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim (1970)
a) S. 844-847
b) S. 1163-1165
c) S. 1200-1204

34. Hägele, E., Dissertation, Fachbereich Chemie der Universität Tübingen (1977)

35. Ryan, L.D. & Vestling, C.S., Arch. Biochem. Biophys. 160, 279-284 (1974)

36. Davis, B.J., Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404-427 (1964)

37. Ornstein, L., Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 321-349 (1964)

38. Maurer, H.R., Disc Electrophoresis, p. 44, Walter de Gruyter, Berlin (1971)

39. Colora Meßtechnik GmbH, UltraPhor: Gerätebeschreibung und Bedienungsanleitung (1972)

40. Laemmli, U.K., Nature 227, 680-685 (1970)

41. Porter, W.H. & Preston, J.L., Anal. Biochem. 66, 69-77 (1975)

42. Weber, K. & Osborn, M. in The Proteins (Neurath, H. & Hill, R.L., eds.), pp. 180-223, Academic Press, New York (1975)

43. Weber, K., Pringle, J.R. & Osborn, M., Methods Enzymol. 26, 3-27 (1972)

44. Weber, K. & Osborn, M., J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969)

45. Mans, R.J. & Novelli, G.D., Arch. Biochem. Biophys. 94, 48-53 (1961)

46. Harris, W. & Ferguson, J.J., Fed. Proc. 26, 678 (1967)

47. Harris, C.E. & Teller, D.C., J. Theor. Biol. 38, 347-362 (1973)

48. Hägele, E., Neeff, J. & Mecke, D., Eur. J. Biochem. 83, 67-76 (1978)

49. Lee, K. & Kenney, F.T., J. Biol. Chem. 246, 7595-7601 (1971)

50. Pitot, H.C., Kaplan, J. & Cihak, A. in Rechcigl, M., Jr. (ed.), Enzyme Synthesis and Degradation in Mammalian Systems, University Park Press, Baltimore, p. 216 (1971)

51. Woodside, K.H., Biochim. Biophys. Acta 421, 70-79 (1976)

52. Manney, T.R., J. Bacteriol. 96, 403-408 (1968)

53. Katsunuma, T., Schött, E., Elsässer, S. & Holzer, H., Eur. J. Biochem. 27, 520-526 (1972)

54. Betz, H., Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 121-130 (1976)

55. Betz, H. & Weiser, U., Eur. J. Biochem. 62, 65-76 (1976)

56. Hansen, R.J., Switzer, R.L., Hinze, H. & Holzer, H., Biochim. Biophys. Acta 496, 103-114 (1977)

57. Neeff, J. & Heer, U., FEBS Lett. 85, 233-236 (1978)

58. Greig, M.E., Walk, R.A. & Gibbons, A., J. Bacteriol. 75, 489-496 (1958)

59. McMahon, D., Plant Physiol. 55, 815-821 (1975)

60. Wildenthal, K. & Griffin, E.E., Biochim. Biophys. Acta 444, 519-524 (1976)

61. Hägele, E., persönliche Mitteilung

62. Brown, H.D., Satyanarayana, T. & Umbarger, H.E., J. Bateriol. 121, 959-969 (1975)

63. Kabat, E.A., Kabat und Mayers Experimental Immunochemistry, 2nd edn., pp. 5, 394, Charles C. Thomas, Springfield (1961)

64. Harboe, N. & Ingild, A. in A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis (Axelsen, N.H., Krøll, J. & Weeke, B., eds.), pp. 161-164, Universitetsforlaget, Oslo (1973)

65. Kwalpinski, J.B.G., Methodology of Immunochemical and Immunological Research, pp. 286, 306, Wiley-Interscience, New York (1972)

66. Philippidis, H., Hanson, R.W., Reshef, L., Hopgood, M.F. & Ballard, F.J., Biochem. J. 126, 1127-1134 (1972)

67. Rietra, P.J.G.M., Molenaar, J.L., Hamers, M.N., Tager, J.M. & Borst, P., Eur. J. Biochem. 46, 89-98 (1974)

68. Cuatrecasas, P., J. Biol. Chem. 245, 3059-3065 (1970)

69. March, S.C., Parikh, I. & Cuatrecasas, P., Anal. Biochem. 60, 149-152 (1974)

Lebenslauf

30.9.1949	geboren in Stuttgart als Sohn des Oberingenieurs Robert Essig und seiner Ehefrau Erna, geb. Rath
1956	Übersiedlung nach Chicago, Illinois, USA
1956 - 1959	Einschulung und Besuch der Klassen 1, 3 und 4 in der Public School
1959	Übersiedlung nach Ditzingen, heute Kreis Ludwigsburg
1959 - 1961	Besuch der Klassen 3 und 4 an der Volksschule in Ditzingen
1961 - 1963	Klassenstufen 5 und 6 am Gymnasium in Korntal
1963 - 1969	Klassenstufen 7 - 13 am Leibniz-Gymnasium in Stuttgart-Feuerbach, Abitur
1969 - 1972	Studium der Chemie an der Technischen Universität Stuttgart, Diplomvorprüfung
1972 - 1976	Studium der Chemie an der Universität Freiburg i.Br., Abschluß mit der Diplom-Chemiker-Hauptprüfung, Diplomarbeit mit dem Thema: "Nachweis und Eigenschaften einer Amylomaltase (E.C. 2.4.1.25) aus Klebsiella pneumoniae. Ein Beitrag zum α-Glucan-Stoffwechsel von Mikroorganismen"
1976	Eheschließung mit Karin Scholl
September 1976 - November 1979	Dissertation am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. D. Mecke über das Thema: "Untersuchungen zum Proteinturnover und zur glucoseabhängigen Enzyminaktivierung in Saccharomyces cerevisiae"

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Professoren und Dozenten:

In Stuttgart:

Anorganische Chemie	H. Krebs, E. Allenstein, E. Fluck, G. Tölg
Organische Chemie	H. Bredereck, F. Effenberger, A. Wagner
Physikalische Chemie	T. Förster, H. Preuß
Technische Chemie	K. Dialer, G. Prauser
Experimentalphysik	J. M. Spaeth
Mathematik	A. Vogel

In Freiburg:

Anorganische Chemie	H. Müller, H. Vahrenkamp
Biochemie	K. Wallenfels, G. Kurz
Makromolekulare Chemie	W. Burchard, H.-J. Cantow, G. Wegner, M. L. Hallensleben
Organische Chemie	C. Rüchardt, J. Lehmann, H. Achenbach, H. Prinzbach, G. Schill, S. Kabuß
Physikalische Chemie	E. Schmid, H. Zimmermann, D. Siebert

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (07472) 22145